

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi SELDA MERCAN

YARALAMALI TRAFİK KAZALARINDA ALKOL VE BAZI BENZODİAZEPİN
GRUBU İLAÇLARIN ARANMASI VE YÖNTEM OPTİMİZASYONU

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYAGER NİHAN DOĞUSAN GÖKÇE
İSTANBUL, 2018

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi SELDA MERCAN

YARALAMALI TRAFİK KAZALARINDA ALKOL VE BAZI BENZODİAZEPİN
GRUBU İLAÇLARIN ARANMASI VE YÖNTEM OPTİMİZASYONU

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYAGER NİHAN DOĞUSAN GÖKÇE

İSTANBUL, 2018



Bu tez projesi İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 20785

Bu tez projesi Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yöneticiliği Tez ve Akademik Çalışmalar Danışma ve İzleme Komisyonu (TAÇDİK) tarafından desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın gerçekleşmesine olanak sağlayan İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Faruk Aşıcıoğlu'na, çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, her türlü desteklerini benden esirgemeyen Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Münevver Açikkol ve danışmanım Sayın Dr. Öğretim Üyesi Selda Mercan'a;

Çalışmam boyunca bilgi ve yorumlarıyla katkı sağlayan ve destekleyen Sayın Dr. Öğretim Üyesi Zeynep Türkmen'e;

Çalışmamı gerçekleştirmemi sağlayan Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi görevlileri Doç.Dr. Savaş Öztürk'e, Prof.Dr. Macit Koldaş'a, Doç.Dr. Özgür Söğüt'e ve acil tıp kliniğinde çalışan tüm doktorlara ve personele;

Laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Laboratuvar Teknisyeni Murat Yayla'ya

Beni destekleriyle her zaman cesaretlendiren ve destek olan arkadaşlarım Arş.Gör. Merve Kuloğlu'na ve Kimyager Tuğba Tekin'e;

Her koşulda desteklerini esirgemeyen ve bu sürecin kolaylaşmasını sağlayan başta annem ve kayınvalidem olmak üzere aileme, eşime ve tabi ki oğlum Yakup'a teşekkür ederim.

Kimyager Nihan Doğusan Gökçe

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
KISALTMALAR	viii
ÖZET	ix
SUMMARY	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Benzodiazepinler	3
2.1.1. Benzodiazepinlerin Kimyasal Yapısı	3
2.1.2. Benzodiazepinlerin Etki Mekanizması	4
2.1.3. Benzodiazepinlerin Farmakokinetik Özellikleri	5
2.1.4. Benzodiazepinlerin Yan Etkileri	6
2.1.5. Diazepam	7
2.1.6. Alprazolam	8
2.1.7. Klonazepam	9
2.2. Alkol	10
2.2.1. Alkolün Adli Bilimlerdeki Yeri	12
2.3. Madde/İlaç Etkisi Altında Araç Kullanımı (DUID)	13
2.3.1. Sayılarla Trafik Kazalarının Sonuçları	14
2.3.2. Madde/İlaç ve Alkol Etkisi Altında Araç Kullanımında Ülkemizdeki Yasal Uygulama	15
2.3.3. Benzodiazepinler, Alkol ve DUID	16

2.4. Kromatografi	18
2.4.1. Kromatografinin Sınıflandırılması	19
2.4.1.1. Ayırma Mekanizmasına Göre	19
2.4.1.2. Kullanılan Düzeneğe Göre	21
2.4.2. Gaz Kromatografisi (GC)	24
2.4.2.1. Kromatografik Sistem	25
2.4.3. Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi (GC-MS)	28
2.4.3.1. GC-MS'de Kalitatif ve Kantitatif Analiz	29
2.4.4. Gaz Kromatografik Analiz için Numune Hazırlanması	31
2.4.4.1. Hidroliz	31
2.4.4.2. Protein Çöktürme	31
2.4.4.3. Çekitleme	32
2.4.4.4. Türevlendirme	34
2.4.5. Kromatografik Yöntemlerle Benzodiazepin Analizi	34
2.4.6. Alkol Analizi	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	37
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Gereçler	38
3.3. Örnek Toplanması	39
3.4. Çalışmaya Katılan Sürücülere Ait Bilgiler	39
3.5. Benzodiazepin Analizi	42
3.5.1. Benzodiazepin Analizinde Kullanılan Çözeltiler	42
3.5.2. Benzodiazepin Analizi için Örnek Hazırlama Basamakları ve Optimizasyonu	44
3.5.3. GC-MS ile Benzodiazepin Analizi	46

3.6. Benzodiazepin Analizinin Optimizasyonu	48
3.6.1. Doğrusallık Çalışmaları	48
3.6.2. Geri Kazanım Çalışmaları	48
3.6.3. LOD, LOQ Hesaplamaları	49
3.7. Alkol Analizi	49
3.7.1. Alkol Analizinde Kullanılan Çözeltiler	49
3.7.2. Alkol Analizi için Örnek Hazırlanması ve Yöntemin Uygulanması	49
3.7.3. Üst Boşluklu (Head Space) GC-MS Analiz Parametreleri	50
3.8. Sürücü Numunelerinin Analizi	51
4. BULGULAR	52
5. TARTIŞMA	70
6. SONUÇ	80
KAYNAKLAR	81
EKLER	86
Ek 1. Etik Kurul Onay Yazısı	86
Ek 2. Asgari Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	89
Ek 3. Katılımcı Bilgi Formu	90
ÖZGEÇMİŞ	91

TABLULAR LİSTESİ

Tablo I: Konsantrasyona göre alkolün gösterdiği etkiler

Tablo II: Çalışmada kullanılan referans standart kimyasal maddelerin isimleri ve markaları

Tablo III : Çalışmada kullanılan cihaz ve gereçlerin isimleri ve markaları

Tablo IV : Çalışmaya katılan sürücülerin genel bilgileri

Tablo V : Çalışmaya katılan sürücülerin ayrıntılı bilgileri

Tablo VI : Kalibrasyon noktalarının konsantrasyonları

Tablo VII : Klonazepam'ın kalibrasyon noktalarının konsantrasyonları

Tablo VIII : Maddelerin alıkonma süreleri (dk.) ve standart sapmaları

Tablo IX : Maddelerin MS spektrumundaki başlıca iyonları (m/z)

Tablo X : Diazepam, alprazolam, klonazepam, klonazepam-TMS ve alkol için LOD ve LOQ sonuçları ($\mu\text{g/mL}$)

Tablo XI : Diazepam, alprazolam ve klonazepam için %Geri kazanım ve %RSD sonuçları

Tablo XII: Pozitif çıkan alkol analiz sonuçları

Tablo XIII : Kromatografik yöntemler kullanarak biyolojik materyalde benzodiazepin analizi yapılan çalışmaların karşılaştırmalı bulguları

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1. : Benzodiazepinlerin kimyasal yapısı
- Şekil 2.2. : GABA_A reseptörünün şekli ve benzodiazepin bağlanma bölgesi
- Şekil 2.3. : Benzodiazepin metabolizasyonunun genel şeması
- Şekil 2.4. : Diazepamın kimyasal yapısı
- Şekil 2.5. : Alprazolamın kimyasal yapısı
- Şekil 2.6. : Klonazepamın kimyasal yapısı
- Şekil 2.7. : Etanolün metabolizasyon aşamalarının şematik görüntüsü
- Şekil 2.8. : GC-MS sisteminin şematik görünümü
- Şekil 2.9. : SPE yönteminin çalışması
- Şekil 3.1. : Diazepam, alprazolam ve klonazepamın kimyasal yapıları
- Şekil 3.2. : Klonazepam-TMS'in kimyasal yapısı
- Şekil 3.3. : Benzodiazepin analizinin yapıldığı GC-MS cihazının görüntüsü
- Şekil 3.4. : Alkol analizinin yapıldığı HS/GC-MS cihazının görüntüsü
- Şekil 4.1. : n-docosane 5µg/mL, Diazepam 20µg/mL, Klonazepam 40µg/mL ve Alprazolam 80µg/mL konsantrasyonlarının kromatogramları (tarama ve SIM yöntemleri ile)
- Şekil 4.2. : n-docosane'a ait kütle spektrumu
- Şekil 4.3. : Diazepam'a ait kütle spektrumu
- Şekil 4.4. : Klonazepam'a ait kütle spektrumu
- Şekil 4.5. : Alprazolama ait kütle spektrumu
- Şekil 4.6. : n-docosane 5 µg/mL, Diazepam 20 µg/mL, Klonazepam-TMS 40 µg/mL ve Alprazolam 80 µg/mL konsantrasyonlarının kromatogramları (tarama ve SIM yöntemleri ile)
- Şekil 4.7. : Klonazepam-TMS'e ait kütle spektrumu
- Şekil 4.8. : Analit içermeyen boş serum kromatogramının görüntüsü (tarama ve SIM yöntemleri ile)

Şekil 4.9. : Katım yapılmış ve türevlendirilmiş serum kromatogramı (40 µg/mL diazepam, 160 µg/mL alprazolam, 80 µg/mL klonazepam-TMS (tarama ve SIM yöntemleri ile)

Şekil 4.10. : Katım yapılmış ve türevlendirilmemiş serum kromatogramı (40µg/mL klonazepam) (tarama ve SIM yöntemleri)

Şekil 4.11. : 0,5g/L konsantrasyondaki etanolün kromatogramı

Şekil 4.12. : Etanola ait kütle spektrumu

Şekil 4.13. : n-butanol'e ait kütle spektrumu

Şekil 4.14. : Alprazolama ait kalibrasyon eğrisi

Şekil 4.15. : Diazepamı ait kalibrasyon eğrisi

Şekil 4.16. : Klonazepamı ait kalibrasyon eğrisi

Şekil 4.17. : Klonazepam-TMS'e ait kalibrasyon eğrisi

Şekil 4.18. : Etanole ait kalibrasyon eğrisi

Şekil 4.19. : 205 mg/dL konsantrasyonda alkol içeren sürücü örneğine ait alkol analizi kromatogramı

KISALTMALAR

BSTFA	: Bis(trimetilsilil)trifloroasetamid
dL	: Desilitre
DUID	: Driving Under The Influence of Drug (Madde/ilaç etkisi altında araç kullanımı)
g	: Gram
GC-MS	: Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrometrisi
HS/GC-MS	: Head Space (Üst Boşluklu) /Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometrisi
IS	: İç Standart
LLE	: Sıvı-Sıvı Çekitleme Yöntemi
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
ng	: Nanogram
SCAN	: Tarama Modu
SIM	: Seçilmiş İyon İzleme
SPE	: Katı Faz Çekitleme Yöntemi
TMCS	: Trimetilklorosilan
TMS	: Trimetilsilil
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre

ÖZET

Benzodiazepinler, merkezi sinir sistemi üzerindeki etkilerinden dolayı uykusuzluk tedavisinde, anksiyete önlemede ve kas ağrılarında sıklıkla reçetelendirilen ve bağımlılık potansiyeli yüksek olan ilaçlardır. Alkol ise tıp, endüstri gibi birçok alanda yaygın şekilde kullanılmaktadır. Alkolün merkezi sinir sistemi üzerindeki etkileri nedeniyle, kullanıcılarda davranış değişiklikleri görülür. Ülkemizde ve dünyada kötüye kullanımı da yaygın olan bu maddeler şiddet, hırsızlık, cinsel saldırı gibi suçların kolaylaşmasına sebep olabilir ve sürüş güvenliğini olumsuz etkileyebilirler. Alkolün yasal ve kolay ulaşılabilir olması da suçun bir parçası olmasını kolaylaştırır.

Bu çalışmada yaralamalı trafik kazalarında alkolün ve benzodiazepinlerden diazepam, klonazepam, alprazolamın varlığı araştırılmıştır. Ayrıca serum örneklerinde benzodiazepin tayini için seçici ve güvenilir bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. Bu amaçla Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Acil Tıp Polikliniği'ne yaralamalı trafik kazaları sonucu başvuran sürücülerden tam kan ve serum örnekleri alınmıştır. Benzodiazepinlerin serumdan nicel ve nitel tayini için Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS) sistemi kullanılarak yöntem geliştirilmiş ve analiz yapılmıştır. Tam kanda alkol analizi için ise Head Space/Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (HS/GC-MS) sisteminden yararlanılmıştır.

Çalışmada; diazepam için 1.25-30 µg/mL doğrusal aralığında $R^2= 0.9997$ ($y=0,3949x-0,0178$) bulundu. Geri kazanım oranı 7.5 µg/mL konsantrasyonda $\%76.67\pm 8.17$, 20 µg/mL konsantrasyonda $\%73.30\pm 7.85$ bulundu. Alprazolam için 5-120 µg/mL doğrusal aralıkta $R^2= 0.9990$ ($y=0,2121x-0,1654$) bulundu. Geri kazanım yüzdeleri 30 µg/mL konsantrasyonda $\%74.53\pm 8.27$, 80 µg/mL konsantrasyonda $\%74.08\pm 9.52$ bulundu. Klonazepam için 10-60 µg/mL doğrusal aralıkta $R^2= 0.9987$ ($y=0,02392x-0,03803$) bulundu. Geri kazanım yüzdeleri

15 µg/mL konsantrasyonda %74.60±9.38, 40 µg/mL konsantrasyonda %70.23±10.23 hesaplandı. Klonazepam-TMS için 10-60 µg/mL doğrusal aralıkta $R^2= 0.9970$ ($y=0,1159x-0,2259$) bulundu.

LOD ve LOQ değerleri sırasıyla diazepam için 0.396 µg/mL ve 1.201 µg/mL, alprazolam için 0.887 µg/mL ve 2.688 µg/mL, klonazepam için 3.472 µg/mL ve 10.521 µg/mL, klonazepam-TMS için 4.885 µg/mL ve 14.802 µg/mL'dir.

Sürücülerden alınan 40 serum numunesinin hiçbirinde diazepam, alprazolam ve klonazepam etken maddelerine rastlanmadı. Alkol analizi için toplanan 37 tam kan numunesinin 6'sında etil alkole rastlandı.

Bu çalışmada sürüş güvenliğini olumsuz etkileyen bazı benzodiazepinlerin varlığını tespit etmek üzere analitik olarak geçerli bir analiz yöntemi geliştirilmiştir, çalışmanın bu yöntem ile daha fazla sayıda olgu ile sürdürülmesi planlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Benzodiazepin, alkol, DUID, GC-MS, diazepam, alprazolam, klonazepam

SUMMARY

Benzodiazepines are frequently prescribed drugs due to their effects on central nervous system in the treatment of sleep disorders, anxiety and muscle pain and also have addiction potential. Moreover, addiction potential of these drugs makes them the most abused prescribed drug group around the world and in our country. Alcohol is widely used in many areas such as medicine and industry. Due to the effects of alcohol on central nervous system, behavioral changes can be observed. Alcohol and benzodiazepines, which are frequently abused can cause violence, theft, and sexual assault crimes and impair driving safety as well. Alcohol is legal and easily accessible which makes it easy to be a part of a crime.

In this study presence of alcohol and diazepam, alprazolam and clonazepam among benzodiazepines on driving ability and injured traffic accidents was investigated. In addition, it was aimed to develop a selective and reliable GC-MS method for determination of benzodiazepines in serum samples. For this purpose, whole blood and serum samples were collected from injured drivers involved in traffic accidents in University of Health Sciences, The Emergency Clinic of Haseki Training and Research Hospital. The method was developed and serum samples were analyzed using the Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) system for the quantitative and qualitative determination of benzodiazepines. For alcohol, whole blood samples were analyzed by Head Space / Gas Chromatography-Mass Spectrometry (HS / GC-MS) system.

In this study, the linearity range of diazepam was found 1.25-30 $\mu\text{g/mL}$ with $R^2= 0.9997$ ($y=0.3949x-0.0178$). The recovery ratios were found $\%76.67\pm 8.17$ at 7.5 $\mu\text{g/mL}$ and $\%73.30\pm 7.85$ at 20 $\mu\text{g/mL}$. The linearity range of alprazolam was found 5-120 $\mu\text{g/mL}$ with $R^2= 0.9990$ ($y=0.2121x-0.1654$). The recovery ratios were found $\%74.53\pm 8.27$ at 30 $\mu\text{g/mL}$ and $\%74.08\pm 9.52$ at 80 $\mu\text{g/mL}$. For clonazepam the linear range was found 10-60 $\mu\text{g/mL}$ and

$R^2 = 0.9987$ ($y = 0.02392x - 0.03803$). The recovery ratios were found $\%74.60 \pm 9.38$ at $15 \mu\text{g/mL}$ and $\%70.23 \pm 10.23$ at $40 \mu\text{g/mL}$. For clonazepam-TMS the linear range was $10\text{-}60 \mu\text{g/mL}$ and $R^2 = 0.9970$ ($y = 0.1159x - 0.2259$).

LOD and LOQ values were $0.396 \mu\text{g/mL}$ ve $1.201 \mu\text{g/mL}$ for diazepam, $0.887 \mu\text{g/mL}$ ve $2.688 \mu\text{g/mL}$ for alprazolam, $3.472 \mu\text{g/mL}$ ve $10.521 \mu\text{g/mL}$ for clonazepam and $4.885 \mu\text{g/mL}$ ve $14.802 \mu\text{g/mL}$ for clonazepam-TMS respectively.

No diazepam, alprazolam or clonazepam active ingredients were found in any of the 40 serum samples collected from drivers. But 6 of 37 whole blood samples were determined as positive for alcohol.

As a conclusion, a validated analytical method was developed for determination of benzodiazepines which impair driving ability, it is planning to conduct for further studies with more cases.

Key words: Benzodiazepines, alcohol, DUID, GC-MS, diazepam, alprazolam, clonazepam

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Amerikan Psikiyatri Birliği'nin tanımlamasına göre “**madde**” terimi kötüye kullanılan bir uyuşturucuyu, tıbbi bir ilacı veya toksik bir maddeyi ifade edebilir. Alkol, amfetaminler, esrar, kokain, halüsinojenler, inhalantlar, nikotin, opiyatlar, fensiklidin ve sedatifler, hipnotikler, anksiyolitikler, reçeteli veya reçetesiz ilaçlar çeşitli madde sınıflarındandır (1, 2).

Maddelerin her türlü kullanımı insan davranışlarını etkileyebilir. Bunun sonucunda bireyler, madde etkisi altında iken, şiddet, saldırı, hırsızlık, cinsel saldırı suçlarının ve ayrıca trafik kazalarının faili veya mağduru olabilirler. Bireyler maddeleri kendilerinin ve çevrelerinin yasal reçeteleri aracılığıyla, sağlık çalışanı olmaları durumunda sahip oldukları iş olanaklarını kullanarak veya internet ve sokaktan yasadışı yollarla elde edebilirler (2, 3).

Alkol ise bireylerde davranış değişikliklerine sebep olur. Karar verme davranışlarında ve algıda bozulma, görsel ve işitsel fonksiyonların zayıflaması, rıza gösterme yetilerinde ve hafızada problemler görülebilir. Alkol ilaçlarla birlikte kullanımı merkezi sinir sistemi üzerindeki etkilerini arttırabilir ve içine konulan maddenin tadını gizleyebilir. Bu da cinsel suçlar başta olmak üzere birçok suçun gerçekleşmesini kolaylaştırır. Bilişsel fonksiyonları ve psikomotor performansı bozması sebebiyle sürüş performansını olumsuz etkiler (2).

Reçeteli ve reçetesiz ilaçların istismarı; ilacın reçete edilmediği halde veya reçete edildiğinden fazla dozda ve farklı amaçlarla kullanılmasıdır. Reçeteli ilaçların yanlış ve kötüye kullanımları, bağımlılık da dahil çeşitli sağlık problemlerine sebep olabilir (2).

Benzodiazepinler anksiyolitik, sedatif, hipnotik ve anti epileptik etki gösteren ve dozlarına göre psikomotor refleksleri yavaşlatabilen ve yaygın olarak reçetelendirilen ilaçlardır. Aynı zamanda yasadışı madde kullanıcıları tarafından da istismar edilmelerinden dolayı adli olgularda da karşılaşılan maddelerdendir (4). Genel olarak güvenli sayılmasına rağmen

özellikle alkol, yasadışı maddeler ve sakinleştiriciler, antidepresanlar gibi diğer ilaçlarla birlikte kullanıldığında ev ve trafik kazası riskini artırır. Ayrıca sebep olduğu uyuşukluk hali, idrakin zayıflaması ve hafıza kayıplarından dolayı cinsel saldırı başta olmak üzere madde etkisi altında gerçekleşen suçlarda kullanılabilirler (5).

Araç kullanımı, gündelik bir aktivite olarak görülmesine rağmen merkezi sinir sistemi ile birlikte organların koordinasyon halinde çalışmasını gerektiren, hızlı düşünerek çabuk hareket edilmesi gereken bir eylemdir (6, 7). Bu yüzden de trafiğe çıkarken sürücülerin, beyin fonksiyonlarını etkileyecek, konsantrasyonu bozacak ve fiziksel yetilerine zarar verecek her türlü davranıştan kaçınması gerekmektedir. Ancak günümüzde trafik yoğunluğunun ve araç sayısının sürekli artması ve araç kullanım sürelerinin uzaması da araç kullanımını olumsuz etkilemektedir (7).

Trafikte sürüş performansını olumsuz şekilde etkileyen ve sürücülerini risk altında bırakan nedenler arasında özellikle alkolün ve sonrasında da yasa dışı maddelerin sebep olduğu sonuçlar artık kamuoyu tarafından bilinmektedir ve birçok çalışmanın konusu olmuştur (8, 9).

Bu çalışmada alkolün ve kontrollü reçeteli ilaçlar sınıfında yer alan benzodiazepinlerden diazepam, klonazepam ve alprazolamın tedavi maksatlı veya istismar edilerek kullanımlarının yaralamalı trafik kazalarında yaygınlıkları ve trafik güvenliğine olan riskleri araştırılmıştır. Bu amaçla Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Acil Tıp Polikliniği ile ortak çalışılarak yaralamalı trafik kazaları sonucu hastaneye başvuran sürücülerden tam kan ve serum numuneleri alınmıştır. Benzodiazepinlerin nicel ve nitel tayini için Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS) sistemi kullanılarak yöntem geliştirilmiş ve analiz yapılmıştır. Alkol analizi için ise Head Space/Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (HS/GC-MS) sisteminden yararlanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

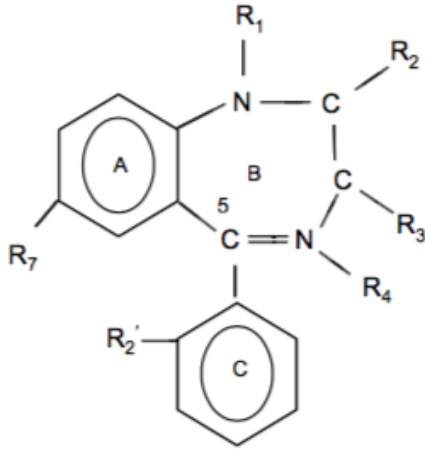
2.1. Benzodiazepinler

1960'lı yıllarda tıbbi uygulamaya başlanmasıyla beraber, benzodiazepinler bir çok ülkede sıklıkla reçetelendirilen ve medikal kullanımının yanında kötüye kullanımı da yaygın olan psikotrop ilaç gruplarından biri olmuştur (5, 10, 11). Bu maddeler, anksiyete ve uykusuzluk tedavisinde, kas ağrılarını önlemede, alkol bağımlılığı tedavisinde, panik bozukluklarda ve epileptik nöbetleri önleme amacıyla kullanılırlar (4, 12). Ayrıca uçak yolculuğu gibi geçici zorlanmaların yaşandığı durumlarda da kullanılabilirler (13). Kullanımlarına göre anksiyolitik, hipnotik, antiepileptik ve anestezi olarak 4 sınıfa ayrılırlar (14).

Benzodiazepinlerin diğer anksiyolitiklere göre terapötik indekslerinin geniş olması, yan etkilerinin daha kolay tolere edilebilir olması, doz aşımında ciddi yan etkilerin daha az görülmesi, düşük ilaç etkileşimi oluşturmaları ve etkilerinin çabuk başlaması, bu maddelerin yaygın olarak tercih edilme sebeplerindendir. Ancak bağımlılık yapma ve istismar potansiyelleri sebebiyle Türkiye'de yeşil reçete ile satılarak kullanımları kontrol edilmektedir (13, 15).

2.1.1. Benzodiazepinlerin kimyasal yapıları

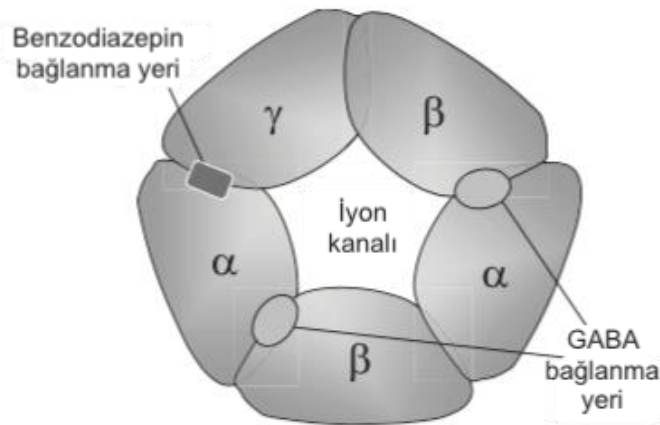
Benzodiazepinlerin ana yapısı benzen halkası (A halkası) ile birleşmiş 7 üyeli diazepin (B halkası) halkasıdır. Klasik benzodiazepinler, 5-aril yapısı (C halkası) ve 1,4 diazepin halkası içerir; bu yapıya 1,4-benzodiazepinler (diazepam, klonazepam) denir. Diazepin halkasındaki 1 ve 2 numaralı pozisyonların triazol ve imidazol halkaları ile birleştirilmesi sonucu triazolbenzodiazepinler (alprazolam) ve imidazolbenzodiazepinler elde edilmiş olur (13). Benzodiazepinlerin kimyasal yapısı Şekil 2.1.'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Benzodiazepinlerin Kimyasal Yapısı (13)

2.1.2. Benzodiazepinlerin etki mekanizması

Benzodiazepinler etkilerini GABA-benzodiazepin reseptör kompleksi üzerinde, kendilerine özgü bölgelere bağlanarak gösterirler. GABA (γ -aminobutirik asit), sinir sisteminin ana inhibitör nörotransmitterdir ve üç ana reseptör alt tipi vardır ($GABA_A$, $GABA_B$ ve $GABA_C$). Benzodiazepin reseptörü olan $GABA_A$ ortasında bir anyon kanalı (Cl^-) bulunan kapalı bir yapıdadır. Benzodiazepinlerin bağlanma yeri ise α ve γ birimlerinin bulunduğu yerdedir ve bağlanmalarıyla beraber iyon kanalının açılma sıklığını artırarak GABA'nın etkilerini kolaylaştırırlar (13, 15). Benzodiazepinlerin $GABA_A$ reseptörüne bağlanmasını gösteren şematik görünüm Şekil 2.2.'de verilmiştir.



Şekil 2.2. $GABA_A$ reseptörünün şekli ve benzodiazepin bağlanma bölgesi (16)

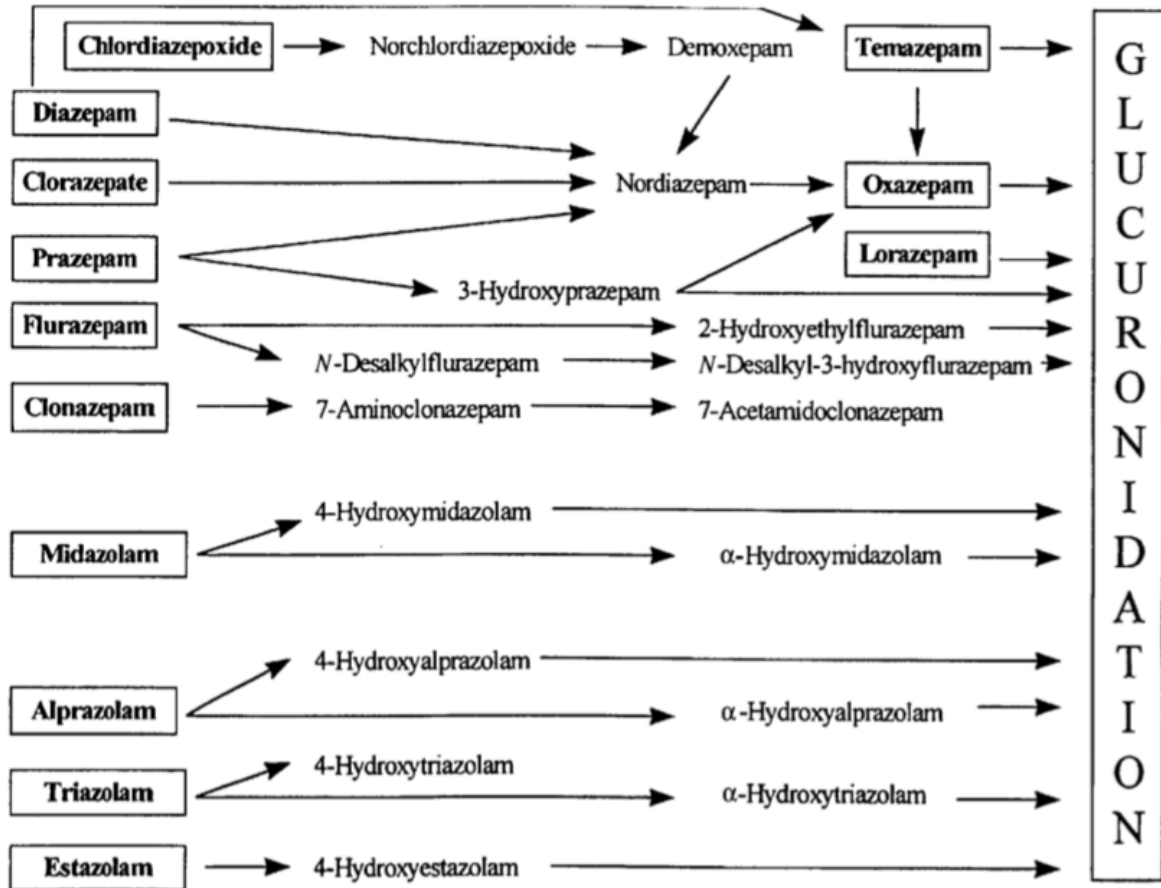
2.1.3. Benzodiazepinlerin farmakokinetik özellikleri

Benzodiazepinler etki sürelerine göre üç gruba ayrılırlar:

Kısa etki süreli benzodiazepinler; yarılanma ömrü 6 saatin altında olanlar (triazolam, midazolam), orta etki süreli benzodiazepinler; yarılanma ömrü 6-24 saat arasında olanlar (alprazolam, flunitrazepam, lorazepam) ve uzun etki süreli benzodiazepinler; yarılanma ömrü 24 saatten uzun olanlardır (diazepam, klonazepam, nordiazepam).

Benzodiazepinler lipofilik karakterdedirler, bu sebeple kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçerler. Ayrıca gastrointestinal sistemden tam olarak emilirler ve kısa sürede plazma pik konsantrasyonuna ulaşırlar. Ancak terapötik etki sürelerini yarılanma ömrünün yanında, dağılım hacimleri de belirler, bu da lipofilik olma derecelerine bağlıdır.

Benzodiazepinlerin metabolizasyonu büyük oranda karaciğerde sitokrom P450 enzimleri ile 3 aşamada gerçekleşir. İlk basamakta diazepam halkasında gerçekleşen N-deasetilasyon reaksiyonu sonucu diazepam, prazepam ve halazepamın ortak ana metaboliti olan desmetildiazepam (nordiazepam) aktif metaboliti elde edilir. Alprazolam gibi orta etki süreli benzodiazepinler bu basamağa uğramazlar. İkinci basamak hidroksilasyon basamağıdır ve sonucunda nordiazepam aktif metaboliti olan oksazepam dönüşür. Hidroksilasyon, ilk basamağa göre çok daha yavaş gerçekleşir. Üçüncü basamak ise hidroksi gruplarının glukuronik asitle konjugasyonudur ve genel olarak inaktif metabolitler oluşur. Kısa etki süreli benzodiazepinler eğer hidroksi grubuna sahip değilse karaciğerde hızlı bir şekilde α -hidroksi metabolitlerine dönüştürülüp glukuronik asit ile konjuge edilerek suda çözünür hale gelir ve böbreklerden atılırlar (13, 14, 15). Benzodiazepinlerin metabolizasyonun genel şeması Şekil 2.3.'deki gibidir.



Şekil 2.3. Benzodiazepin metabolizasyonunun genel şeması (17)

2.1.4. Benzodiazepinlerin yan etkileri

Benzodiazepinlerin en sık görülen yan etkileri sedasyon ve uyuşukluk halidir. Özellikle yüksek dozlarda psikomotor performansı bozabilirler. Ayrıca algılama, anımsama ve yeni şeyler öğrenme gibi bilişsel işlevleri de olumsuz etkileyebilirler (13, 15).

Benzodiazepinler bağımlılık potansiyeli olan ve kötüye kullanılan ilaçlardır. Doza ve kullanım süresine bağlı olarak fiziksel ve psikolojik bağımlılık, yoksunluk sendromu, bilişsel bozukluklar görülebilir ve tolerans gelişebilir. Uzun süreli, yüksek dozda kullanımlarda ilaç aniden kesildiğinde yoksunluk belirtileri de daha şiddetli görülür. Benzodiazepinlerin bağımlılığı veya istismarı psikiyatrik tedavi görenlerde ve maddeleri kötüye kullananlarda

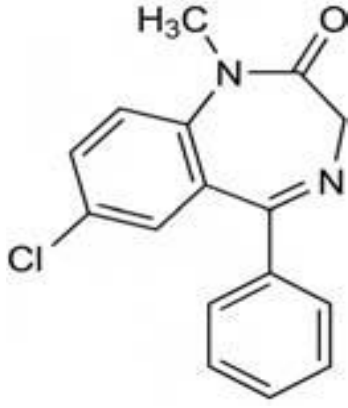
genel popülasyona göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca daha önceden benzodiazepin kullanan bireylerin uzun süreli kullanıcı olma eğilimleri de vardır (14, 15, 18).

Benzodiazepinlerin motor koordinasyonu bozması ve psikomotor reaksiyon hızını azaltması, sedasyon, sersemlik ve dikkatin zayıflaması gibi yan etkileri sürüş güvenliğini tehlikeye atabilir. Alkol ve benzeri ilaçlarla kombine kullanımı da santral sinir sistemi üzerindeki etkilerini artırır (13, 19).

2.1.5. Diazepam

Diazepamın kimyasal formülü $C_{16}H_{13}ClN_2O$ ve molekül ağırlığı 284.8'dir. Kimyasal adı ise 7-Chloro-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-2-one'dir (20). Diazepamın kimyasal yapısı Şekil 2.4.'deki gibidir.

İlk sentezlenen benzodiazepin klordiazepoksidin ardından 1963 yılında diazepamın da klinik kullanımına başlanmıştır. Anksiyolitik etkili benzodiazepinlerdendir. Ağızdan alındığında hızlı bir şekilde emilir ve etkileri çabuk başlar. Yaklaşık 30-90 dakika arası bir sürede pik plazma seviyesine ulaşır. Daha lipofilik olduğundan dağılımı yüksektir, kan-beyin bariyerini hızlı bir şekilde geçebilir. Plazma proteinlerine bağlanma oranı %98-99 seviyelerindedir. Uzun etki süreli benzodiazepinlerdendir ve yarılanma ömrü 20-100 saat arasındadır. Aktif metaboliti desmetildiazepamın (nordazepam) yarılanma ömrü ise 40-100 saat arasında değişmektedir. Bu süreler yaşlılarda ve bebeklerde daha uzun olabilir. Alınan dozun yaklaşık %70i idrarla atılır ve diazepamın çok az bir miktarı değişmeden kalır. Günlük kullanım dozu 5-30 mg arasındadır. Plazmadaki terapötik konsantrasyonu 0.1-2.5 mg/L'dir. Kandaki derişimi 1.5 mg/L'yi geçtikten sonra toksik etkiler meydana gelebilir. İlacın başlıca yan etkisi aşırı uyku halidir (13, 20).



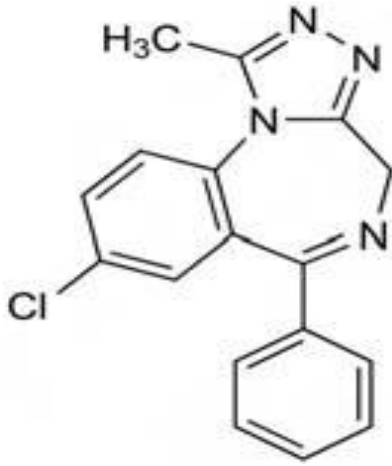
Şekil 2.4. Diazepamın Kimyasal Yapısı (20)

2.1.6. Alprazolam

Alprazolamın kimyasal formülü $C_{17}H_{13}ClN_4$ ve molekül ağırlığı 308.8'dir. Kimyasal adı ise 8-Chloro-1-methyl-6-phenyl-4H-[1,2,4]-triazolo[4,3-a][1,4]- benzodiazepine'dir (20). Alprazolamın kimyasal yapısı Şekil 2.5.deki gibidir.

Alprazolam 1,4-benzodiazepin yapısına triazol grubunun eklenmesiyle oluşmuş bir benzodiazepindir. Yaygın anksiyete bozukluğu ve panik atak tedavisinde sık kullanılır ve kısa sürede etkileri görülür. Antidepresan etkisinden dolayı depresyon tedavisinde de kullanılır (13).

Orta etki süreli benzodiazepinlerdendir ve yarılanma ömrü 11-15 saat arasındadır. Ağızdan alındıktan sonra 1-2 saat içerisinde pik plazma seviyesine ulaşır. Aktif metabolitleri α -hidroksialprazolam ve 4-hidroksialprazolamdır. Yaklaşık %80'i idrarla vücuttan atılır. Günlük dozu 1-3 mg arasındayken panik atak tedavilerinde 10 mg'a kadar kullanılabilir. Toksik etkileri 0.1-0.4 mg/L serum konsantrasyonunda görülmektedir (20).



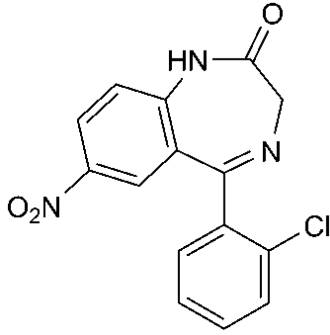
Şekil 2.5. Alprazolamın Kimyasal Yapısı (20)

2.1.7. Klonazepam

Klonazepamın kimyasal formülü $C_{15}H_{10}ClN_3O_3$ molekül ağırlığı 315.7'dir. Kimyasal adı ise 5-(2-Chlorophenyl)-7-nitro-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepin-2-one'dir (20). Klonazepamın kimyasal yapısı Şekil 2.6.'deki gibidir.

Klonazepam genel olarak alprazolam ile benzer etkilere sahiptir ancak yarılanma ömrü daha uzun olduğundan anksiyeteyi daha uzun süre kontrol altında tutabilir (13).

Uzun etki süreli benzodiazepinlerdendir ve yarılanma ömrü yaklaşık 20-40 saat arasındadır. Günlük dozu ise yaklaşık 4-8 mg'dır. Plazmada terapötik konsantrasyonu 0.02-0.07 mg/L'dir. Toksik etkiler 0.1mg/L'den itibaren görülebilir. Oral yolla vücuda alındıktan yaklaşık 4 saat sonra pik plazma seviyesine ulaşır. Metabolitleri sırasıyla 7-aminoklonazepam ve 7-acetamidoklonazepamdır. 7-aminoklonazepam az miktarda aktiftir. Klonazepamın tamamına yakını parçalandıktan sonra idrardan atılır ve idrardan atılma oranı %70 civarındadır (20).

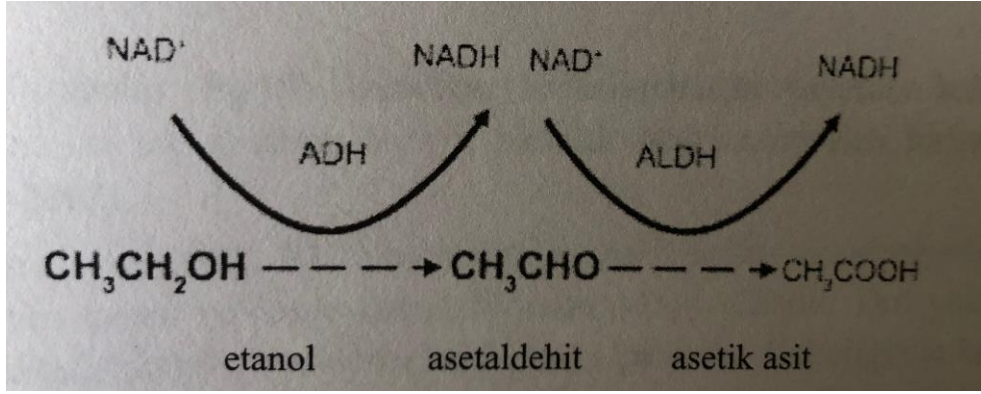


Şekil 2.6. Klonazepamın Kimyasal Yapısı (20)

2.2. Alkol

Alkol; tıp, endüstri gibi birçok alanda yaygın şekilde kullanılmaktadır. Alkollü içeceklerin temel maddesi olmasından dolayı etanol (etil alkol), ilk çağlardan beri insanlar tarafından bilinmekte ve kullanılmaktadır. Karbonhidratların fermantasyonu veya distilasyonu ile elde edilen, keyif verici ve bağımlılık yapıcı özelliği olan etil alkol; renksiz, uçucu, yanıcı, kendine has kokusu ve tadı olan bir maddedir. Kaynama noktası 78.5°C ve erime noktası -117.3°C'dir. Organik çözücülerde ve suda çözünürlüğü yüksektir (14, 21).

Alkolün yağda ve suda çözünürlüğü yüksek olduğundan mide bağırsak kanalından pasif difüzyonla hızlı bir şekilde ve tam olarak emilebilir. Sıvı olması, küçük moleküllü olması ve iyonize olmaması absorpsiyonu hızlandırır. Büyük bir kısmı ince bağırsaktan emilir ve ince bağırsaktaki absorpsiyon hızı mideden daha fazladır. Normal şartlarda alındıktan sonra 40-60 dakika içinde maksimum kan konsantrasyonuna ulaşır. Alkol, kan beyin bariyerini de hızla geçebilmektedir (15, 21). Alkolün %98'e kadar olan kısmı karaciğerde metabolize olur, geri kalanı ise solunum, idrar, ter ve tükürük ile değişmeden vücuttan uzaklaştırılır. Etil alkolün metabolizasyonu Şekil 2.7.'de şematik olarak gösterilmiştir. Bu sayede kandaki alkol seviyesinin belirlenmesinde solunum havasından yararlanılır. Solunum havasındaki alkol miktarı, kandaki konsantrasyonun iyi bir göstergesidir (15, 21).



Şekil 2.7. Etanolün metabolizasyon aşamalarının şematik görüntüsü (15)

Alkolün merkezi sinir sistemi üzerindeki etkileri nedeniyle, kullanıcılarda davranış değişiklikleri görülür. Az miktarda alındığında endişe ve sıkılganlık halini azaltır, öfori oluşturur, özgüveni artırır. Bireylerde konuşkanlık ve hareket etme eğilimi görülebilir. Bilişsel aktivitelerde zayıflamaya sebep olur. Kandaki alkol seviyesinin artmasıyla duygularda dalgalanmalar görülebilir. Ayrıca motor kontrol bozukluğu, konuşmada bozulma, sendeleme, olaylara reaksiyon vermede yavaşlama, hafıza sorunları görülebilir. Bunun dışında alkolün düşük dozları solunum merkezini aktive ederken doz artmasıyla baskılayıcı etki oluşturmaya başlar. Alkolün sinir hücrelerinin membranında nöronlar arası iletişimde iyon akışını ve hücre membranının yapısını etkilediği düşünülmektedir. Sinir hücreleri arasındaki sinyal akışını bozmaktadır (15, 21). Tablo I alkolün kandaki konsantrasyonuna göre kullanıcılarda gösterdiği etkileri belirtmektedir.

Tablo I. Konsantrasyona göre alkolün gösterdiği etkiler (21)

Konsantrasyon mg/dL (promil)	Etki
10-50 (0.10-0.50)	Belirgin bir bozukluk yaratmaz, reflekste hafif baskılanma yapar.
30-120 (0.30-1.20)	Öfori, çok konuşma, azalmış baskılanma, yargılanma yeteneğinde ve kontrolde azalma, ince motor hareketlerinde azalma
90-250 (0.90-2.50)	Duygusal değişkenlik, algı ve hafızada bozulma, görüş yeteneğinin azalması, denge bozukluğu
180-300 (1.80-3.00)	Baş dönmesi, çift görme, azalmış kas koordinasyonu, telaffuzda bozulma
350-500 (3.50-5.00)	Koma, anestezi, reflekslerin ciddi olarak baskılanması, solunum ve dolaşım gerçekleşmemesi ihtimali, olası ölüm

2.3.1. Alkolün adli bilimlerdeki yeri

Alkolün tek başına veya diğer psikotrop maddelerle kullanımının sebep olduğu etkiler cinsel saldırı suçları da dahil olmak üzere çeşitli suçların işlenmesini kolaylaştırabilir. Alkollü içecekler, içine eklenen maddenin tadının baskılanmasını sağlayabilir ve maddenin etkisini arttırabilir. Alkolün yasal ve kolay ulaşılabilir olması da suçun bir parçası olmasını kolaylaştırır (7).

Alkol, motor koordinasyonu ve bilişsel aktiviteleri bozarak araç sürüş yeteneğini de olumsuz etkilemektedir. Ayrıca alınan alkol miktarına bağlı olarak olaylara tepki verme davranışı da etkilenir. Görme duyusunun zayıflaması ve denge bozukluğu da alkol kullanımının sonuçlarındandır. Bunların yanında alkolün ruhsal durumu etkilemesi; cesaret artışına sebep olarak kişilerin risk alma eğiliminde olması da trafik güvenliğini olumsuz etkileyen faktörlerdendir (21).

2.3. Madde/İlaç Etkisi Altında Araç Kullanımı – DUID

Madde/ilaç etkisi altında araç kullanımı (DUID – Driving Under The Influence of Drugs), bireylerin yasa dışı madde veya medikal ilaç tüketiminden sonra trafik güvenliğine engel olabilecek araç sürme eylemini tanımlamak için kullanılan bir terimdir (22).

Yasadışı maddelerle gündelik hayatta kullanılan reçetelendirilmiş bazı psikotrop ilaçların merkezi sinir sisteminde göstereceği etki ve/veya yan etkiler, dikkat ve refleks kayıplarına, görme yetisinin zayıflamasına, karar verme yeteneğinin azalmasına, özgüven ve risk alma davranışlarının artmasına neden olarak, sürüş performansını olumsuz etkilemeleri nedeniyle trafik kazası riskini arttırmırlar (23, 24).

Avrupa Birliği tarafından 2006 - 2011 yılları arasında gerçekleştirilen Avrupa’da Uyuşturucu Madde, Alkol ve İlaç Etkisi Altında Araç Kullanımı – Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines in Europe (DRUID Project) projesinde 13 ülkede trafikte seyir halinde bulunan yaklaşık 50.000 sürücünün kan ve ağız içi sıvılarıyla analizler yapılmıştır. Proje sonucunda alkol oranı % 3.48, yasa dışı madde % 1.9 bulunmuş, medikal ilaçlara da % 1.36 oranında rastlanmıştır. Ayrıca ilaçların sürüş güvenliğine etkilerine göre 4 sınıfa ayrıldığı bir kategorizasyon sistemi ortaya çıkmıştır. Kategori 0; güvenliği olduğu düşünülen ilaçlar, kategori 1; sürüş üzerinde düşük seviyede etkileri olan ilaçlar, kategori 2; sürüşü orta derecede etkileyen ilaçlar ve kategori 3; sürüşü ciddi şekilde etkileyen ve tehlikeli sayılabilecek ilaçlar. Böylelikle gündelik hayatta kullanılan reçeteli/reçetesiz ilaçların ve diğer uyuşturucu/uyarıcı maddelerin bilinçli/bilinçsiz kullanımlarının, alkol ve ilaçlarla birlikte kullanımlarının ölüm ve yaralanmaya sebep olan trafik kazalarının riskini arttırdığı ortaya çıkmıştır (7, 8).

Avrupa Birliği'nin 2006-2011 yılları arasındaki DRUID Projesi kapsamında yürüttüğü bir başka çalışmada ise, çeşitli tıbbi ilaçların (hipnotikler, anksiyolitikler, opioid ve opioid olmayan analjezikler ve antipsikotikler) kullanımının trafik kazalarında etkilerini değerlendirmek için deneyler yapılmıştır. İlaçların etkilerini gözlemlemek için 9 farklı deneysel çalışmada gerçek veya simüle edilmiş sürüş performansından ve buna bağlı toksikolojik analizlerden yararlanılmıştır (25).

2.3.1. Sayılarla Trafik Kazalarının Sonuçları

Teknolojik gelişmeler ve nüfus artışı motorlu araçların yaygınlaşmasını ve ulaşımın kolaylaşmasını sağlarken çevre kirliliğini, trafik yoğunluğunu ve motorlu araç kazalarını da beraberinde getirir (26, 27). Trafik kazaları, karayolları trafik yönetmeliğinde şu şekilde tanımlanmıştır: “karayolu üzerinde hareket halinde olan bir veya birden fazla aracın karıştığı ölüm, yaralanma ve zararlı sonuçlanmış olan olaydır” (28).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2015 yılı yol güvenliği raporuna göre, trafik kazalarına bağlı ölümler tüm ölüm nedenleri arasında 9. sırada olmasına rağmen 2030 yılında bunun 7. sıraya yükseleceği öngörülmektedir. Ayrıca 15-29 yaş arası ölüm nedenlerine bakıldığında, trafik kazası yaralanmalarının sebep olduğu ölümlerin bu yaş grubundaki tüm ölüm sebepleri arasında ilk sırada bulunduğu da raporda yer almaktadır (29).

Türkiye İstatistik Kurumu'nun verilerine göre ise 2004 yılı boyunca 537.352 trafik kazası meydana gelmiştir ve bunların 77.088'i ölümlü yaralanmalı trafik kazasıdır, 4.427 hayatını kaybederken 136.437 kişi de yaralanmıştır (30). 2014 yılında ise trafik kazası sayısı 1.199.010'na yükselirken bu kazaların 1.030.498 adedi maddi hasarlı, 168.512 adedi ölümlü veya yaralanmalı trafik kazasıdır. Bu kazalarda 3.524 kişi hayatını kaybederken 285.059 kişinin de yaralandığı kaynaklarda yer almaktadır. Meydana gelen ölümlü yaralanmalı trafik

kazalarına sebep olan kusurların sebeplerine bakıldığında ise 193.215 kusurun %88,6'sının sürücü kaynaklı olduğu bildirilmiştir (31). Son yayınlanan 2016 yılına ait verilere bakıldığında ise 185.128 adet ölümlü yaralanmalı trafik kazası sonucu 303.812 kişi yaralanmıştır. Türkiye İstatistik Kurumu'nun verilerine göre kazaya neden olan kusurlara bakıldığında, sürücü kaynaklı kusurlar %89,6 oranındadır (32). Bu verilere göre kazaların yaygınlığı ve sıklığı, sebep olduğu ölüm ve yaralanma oranları ve ekonomik sonuçları göz önüne alındığında bunun bir halk sağlığı problemi olduğu söylenebilir.

2.3.2. Madde/İlaç ve Alkol Etkisi Altında Araç Kullanımında Ülkemizdeki Yasal Uygulama

Türkiye'de de tüm dünyada olduğu gibi bu konuda gerekli yasal sınırlamalar uzun yıllar önce getirilmiştir. 5237 sayılı Türk Ceza Kanunu'nun 179/3. maddesinde alkol veya uyuşturucu madde etkisi altında araç kullanımı "Topluma Karşı Suçlar" başlığı altında "Trafik Güvenliğini Tehlikeye Sokma" suçları içinde yer almaktadır (33). Karayolları Trafik Yönetmeliği'nin 97. maddesinde ise alkol, uyuşturucu ve uyarıcı maddeler etkisi altında araç kullanmanın kriterleri ve cezaları çok daha ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Alkollü araç kullanımına hususi araçlar için 0.50 promile kadar izin verilmişken diğer araçlar için bu sınır 0.20 promil olarak belirlenmiştir. Uyuşturucu ve uyarıcı maddelerin trafikte kullanımı ise herhangi bir yasal sınır olmaksızın tamamen yasaklanmıştır (34).

2.3.3. Benzodiazepinler, Alkol ve DUID

Benzodiazepin grubu ilaçların medikal kullanımlarının yanında kötüye kullanımları da mevcuttur. 2004-2011 yılları arasında yapılan bir araştırmada ABD'nin büyük şehirlerinde benzodiazepinlerin amacı dışında kullanımları sebebiyle acil servise yapılan başvuruların yıllar içinde arttığı belirtilmiştir (35).

Ülkemizde Adli Tıp Kurumu'nda benodiazepinlerle ilgili yapılan bir çalışmada 2008-2009 yılları arasında 5. İhtisas Kurulu'nda 5237 sayılı kanunun "üretimi resmi makamların iznine veya satışı yetkili tabip tarafından düzenlenen reçeteye bağlı olan ve uyuşturucu veya uyarıcı madde etkisi doğuran maddeler" hakkındaki maddesi kapsamında değerlendirilen dosyalar arasında en sık karşılaşılan ilaç grubu %82.3 oranında benzodiazepinlerdir. Benzodiazepinler arasından da en çok klonazepam, diazepam, alprazolam ve lorazepam ile karşılaşılmıştır (36).

2012 yılında İstanbul'da 10. sınıf öğrencileriyle yapılan bir araştırmada ise tütün, alkol ve madde kullanımının yaşam boyu en az bir kere deneme oranına bakılmıştır ve benzodiazepinler; nargile, alkol, sigara ve uçucu maddelerin hemen arkasından gelmektedir (37).

Benzodiazepinlerin psikomotor performansı olumsuz etkilemesi, sedasyon, sersemlik ve bilişsel aktivitelerin zayıflaması gibi yan etkileri sürücülerin trafikte ihtiyacı olan direksiyon hakimiyeti, hız kontrolü, yol takibi ve acil durumlarda karar verme becerisi gibi davranışlarını etkileyebilir (19). Uluslararası Alkol, Uyuşturucu ve Trafik Güvenliği Konseyi (ICADTS) medikal ilaçları sürüş performansına etkilerine göre 3 kategoriye ayırmıştır. Benzodiazepin grubu ilaçlar da genel olarak sürüş performansı için orta seviyede olumsuz etkileri olan Kategori 2 ve potansiyel olarak tehlikeli görülen Kategori 3'de sınıflandırılmıştır. Kategori 2 için kan alkol konsantrasyonu 0.5-0.8 g/L aralığına eşdeğer

görülürken, Kategori 3 için ise kan alkol konsantrasyonu >0.8 g/L seviyesine eşdeğer görülmektedir. Birçok Avrupa Birliği ülkesi için kan alkol konsantrasyonunun yasal sınırının 0.5 g/L olduğu düşünüldüğünde benzodiazepin grubu ilaçların sürüş performansına olan etkileri dikkate alınmalıdır (19, 38).

Öte yandan, alkol kullanan bir sürücünün kaza yapma riski, 4-10 kat arası artmaktadır. Kandaki alkol konsantrasyonu arttıkça bu risk artar. Ancak alkolün her birey üzerindeki etkileri değişkenlik gösterebildiğinden, hangi seviyede olursa olsun risk oluşturduğuna dikkat edilmelidir. Amerika'da 2013 yılında yapılan bir çalışmada trafik kazaları sonucu ölen sürücülerin yaklaşık yarısının alkol kullandığı bildirilmiştir. Türkiye'de ise Trafikte Alkol ve Uyuşturucu ile Etkin Mücadele Sempozyumu sonuç bildirgesine göre, sürücüler arasında alkol tespit edilme oranının $\%15.4-35.2$ arasında değiştiği belirtilmektedir (15, 39).

Ülkemizde 2010-2011 yılları arasında gerçekleşmiş trafik kazalarını kapsayan bir çalışmada, 4274 sürücünün 91'inde alkolün yanı sıra bir psikoaktif madde tespit edilmiştir. Bunların $\%44$ 'ünde sadece alkol, kalanında ise kannabis (esrar), benzodiazepinler, barbituratlar, antidepresanlar, kokain ve amfetaminler bulunmuştur (23).

2012-2015 yılları arasında İskoçya'da ölümlü kazaların sonucunda sürücü ve motosiklet sürücülerinden alınan örneklerle yapılan toksikolojik analizlerde alkol ve kannabiodlerden sonra en çok opioidlere ve benzodiazepinlere rastlanmıştır (40). Hastanelerin acil servislerine gelen yaralamalı trafik kazalarıyla yapılan bir çalışmada ise alkolün ve yasal ve yasadışı ilaç ve maddelerin analizleri yapılmıştır. Alınan numunelerde alkol seviyesi yasal sınırın üzerinde olan sürücü oranı $\%26$ bulunurken, diazepam oranı $\%1.1$ ve alprazolam $\%0.2$ bulunmuştur (41).

Kore’de yol kenarı testlerinde alkol için pozitif sonuç verdiği görülen sürücülerle yapılan bir çalışmada, toksikolik analizlerde benzodiazepine de rastlanmıştır (42). İsveç’te ise bozulmuş sürüş sebebiyle yakalanan sürücülerden alınan kan örneklerinde diazepam ve nordiazepam oranlarına bakılmıştır (43). Ayrıca Avrupa Birliği’nin çalışmasına göre sürücüler arasında en sık rastlanan medikal ilaç grubunun da benzodiazepinler olduğu bildirilmiştir, ardından opioidler ve z-druglar gelmektedir (8).

Birçok ülkede trafik kazalarına sebep olan kusurlar incelendiğinde, alkolün olumsuz etkileri daha iyi takip edilip raporlandığı halde, yasal ve yasadışı birçok ilaç ve maddenin kullanım yaygınlığı ve etkileriyle ilgili çalışmalar devam etse de halen yeterli değildir (44).

2.4. Kromatografi

Kromatografi, kompleks karışımlarda bulunan bileşenleri ayırmak, teşhis ve tayin etmek için kullanılan yöntemleri kapsar. Yunancada “chroma” renk ve “graphein” yazı anlamına gelmektedir. Kromatografinin tarihi yirminci yüzyılının başlarına dayanır. Rus botanikçi Michael Tswett çalışmalarında yaprak pigmentlerinin protein molekülleri tarafından adsorplandıklarını gözlemlemiştir. Ayrıca geliştirdiği bir cam kolonla klorofil, ksantofil gibi birçok bitki pigmentini ayırmayı başarmıştır. Ayrılan maddelerin kolonda renkli bantlar şeklinde görünmesi yönteme kromatografi ismini vermesine sebep olmuştur (45, 46).

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği’nin (International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC) tanımına göre; kromatografi ayrılacak bileşenlerin iki faza dağıldığı bunlardan birinin durağan (sabit faz) iken ve diğerin belirli bir yöne ilerlediği (mobil faz) fiziksel bir ayırma yöntemidir (47).

Kromatografik ayırmalarda numune, gaz veya sıvı hareketli faz (mobil faz) ile beraber bir kolonda veya katı bir yüzeyde bulunan ve numuneyle karışmayan durağan faz (sabit faz)

içinden geçirilir. Bu fazlar seçilirken numune bileşenlerinin hareketli ve sabit fazlarda farklı oranlarda dağılması ve ortamı farklı zamanlarda terk etmeler amaçlanır. Hareketlerindeki hız farklılığından dolayı numune bileşenleri kolonda bantlar halinde ayrılırlar. Ayrılan bantlar cihazdaki detektör içinden geçerken elektronik sinyalleri oluştururlar. Bu sırada kaydedici, her bandı bir pik haline dönüştürür ve bunlar kromatogram şeklinde gözlenir. Böylece kalitatif veya kantitatif analizler yapılabilir (45, 46).

2.4.1. Kromatografinin sınıflandırılması

2.4.1.1. Ayırma mekanizmasına göre

2.4.1.1.1. Adsorpsiyon Kromatografisi

Maddelerin adsorpsiyon enerjilerine bağlı olarak farklı oran ve kuvvette adsorbe olmaları esasına dayanır. Yani maddenin mobil ve sabit faz üzerindeki adsorpsiyon noktaları arasında dengeye varmasıyla ayırma gerçekleşir. Böylece maddeler kromatografi kolonunda bantlar halinde birbirinden ayrılır. Oluşan piklerle miktar tayini yapılır (46, 48).

Adsorpsiyon kromatografisi ilk keşfedilen kromatografik yöntemdir. Bu yöntemle izomerleri, hidrokarbonları, hormonları ve antibiyotikleri ayırmak mümkündür. Ancak yöntemin bazı dezavantajları da vardır. Bunlar kısaca: adsorpsiyon noktalarında ayrılması planlanan maddelerin parçalanmasıyla beklenenin dışında bir madde bulunması, sabit fazın maddeler ile kimyasal reaksiyona girmesi, uygun bir sabit ve mobil faz bulmanın bazen uzun sürmesidir (49).

2.4.1.1.2. Dağılma kromatografisi

Maddelerin mobil faz ve sabit faz arasında dengeye varmasıyla gerçekleştirilen ayırma işlemine dağılma kromatografisi denir. Maddeler, dağılma kat sayılarına bağlı olarak farklı

hızlarda hareket ederler ve birbirlerinden ayrılırlar böylelikle bir denge kurulmuş olur. Bu dengelerin kurulma sürelerinin farklılığından dolayı kolondan farklı zamanlarda detektöre ulaşırlar ve maddelerin kromatogramları elde edilir. Yani maddeler birbirine karışmayan iki faz içerisindeki çözünürlüklerine bağlı olarak dağılırlar (46, 48).

Mobil faz sıvı veya gaz, sabit faz ise kolonunun iç yüzeyinde kaynama noktası yüksek sıvı veya katı olabilir. Mobil fazın sabit fazda çözünmemesi veya birbirlerine karışmamları gerekmektedir. Bu yöntemle birbirlerine yakın maddeleri ayırmak mümkündür (48, 49).

2.4.1.1.3. İyon değiştirme kromatografisi

Katı bir maddenin yapısındaki iyonları, çözeltide bulunan aynı cins yüklü başka iyonlarla değiştirmesine dayanan bir ayırma yöntemidir. Sabit fazda anyon veya katyonları değiştirebilen fonksiyonel gruplar bulunur. İyonik maddelerden oluşan numunenin iyonlarının kromatografik sistemde sabit fazdaki anyon ve katyonlarla yer değiştirmesiyle denge oluşur. Ayrımı yapılacak maddeye göre sabit fazda anyon değiştirici veya katyon değiştirici kullanılabilir (46, 49).

İyon değiştirici seçerken, çözelti ortamında hiç çözünmeyen büyük molekülü maddelerden olmasına dikkat edilir. Günümüzde organik iyon değiştiriciler daha fazla kullanılmakla beraber inorganik ve organik olabilirler. Bu yöntemle ayrılmaları zor olan bazı iyon ve asitlerin birbirlerinden ayrılması sağlanabilir (46, 48).

2.4.1.1.4. Jel filtrasyon kromatografisi (moleküler elek kromatografisi)

Bu yöntemde ayırma işlemi maddelerin molekül büyüklüklerine bağlıdır. Kütlesi büyük olan moleküller, gözenekli taneciklerden oluşan filtre edici jelden (sabit faz) daha kolay geçer ve kolondan daha çabuk çıkar. Diğer yöntemlerden farklı olarak burada mobil fazdaki

maddelerle sabit faz arasında hiçbir etkileşim olmaz. Büyük molekülü maddelerin jelin küçük gözeneklerine girememesinden dolayı sabit fazdan hızlıca geçebilirler. Küçük moleküller ise gözeneklerine girer ve içinde dolaşırlar. Böylelikle ayırım gerçekleşmiş olur. Bu yöntemde sabit faz olarak seçilen jelin gözenekleri ne kadar küçük olursa ayırma gücü o kadar iyi olur ancak kolonun akış hızı da yavaşlar. Bu yöntem polimerlerin ayırımında tercih edilen yöntemlerden biridir (46, 48).

2.4.1.1.5. Affinite kromatografisi

Affinite kromatografisi, protein-ligand, enzim-substrat, antijen-antikor gibi seçici etkileşimlere dayanan ayırma yöntemidir. Karışımda bulunan proteinlerden sadece bir tanesi kolondaki sabit faz tarafından elektriksel çekimle tutulur ve öteki proteinlerden ayrılır. Bu ayırmayı da sabit faza kovalent bağla bağlanmış bir başka protein türü yapar (46, 48).

2.4.1.2. Kullanılan düzeneğe göre

2.4.1.2.1. Düzlemsel (planar) kromatografi

Düzlemsel kromatografide, sabit faz düz bir plaka üzerinde veya bir kağıdın gözenekleri arasında bulunur ve mobil faz ise sabit faz boyunca kılcallık etkisiyle veya yer çekimiyle hareket eder (45).

- Kağıt Kromatografisi

Bu yöntemin mantığı dağılma kromatografisiyle aynıdır. Dağılma kromatografisinde bulunan sabit faz yerine burada özel olarak yapılmış bir kağıt bulunmaktadır. Belli bir boyuttaki kağıda, ayrılması beklenen karışım damlatılır. Daha sonra bu kağıt, içinde yürütücü sıvı karışımı (mobil faz) olan bir sıvı içinde bekletilir. Sıvı, kağıt üzerinde ilerlerken karışım

içindeki maddeler kağıt üzerinde farklı hızlarda sürüklenirler. Maddeler renkli ise ayrımı takip etmek kolaydır yoksa uygun ayıraçlar yardımıyla sürüklenme gözlenebilir. Kağıt üzerinde oluşan lekelerin sürüklendikleri mesafe, alanları ve şiddetlerinden kantitatif analiz yapılabilir. Gerektiğinde uygun bir çözücü kullanılarak kağıt üzerinden alınır ve enstrümantal yöntemlerle kalitatif analizleri de yapılabilir (48, 49).

- İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

İnce tabaka kromatografisi yöntem olarak kağıt ve adsorpsiyon kromatografilerine benzer. Bu yöntemde ayırma ortamı kağıt yerine cam veya plastik bir tabakadır ve üzerinde sabit fazın olduğu silika jel, talk, toz selüloz gibi toz katı madde bulunur. Örnek bir uca damlatılır ve kağıt kromatografide olduğu gibi maddelerin mobil fazda yürümleri izlenir. Gerektiğinde lekeler tabakadan alınıp diğer enstrümantal yöntemlerle analizleri yapılabilir (48, 49).

Bu yöntem kağıt kromatografisine benzemesine rağmen bazı yönlerden daha gelişmiştir. Bunlar;

- Kağıt kromatografisinde sabit faz yalnız kağıt iken burada farklı maddeler kullanılabilir.
- Daha az miktarda örnekle çalışılabilir ve sonuç daha kısa sürede elde edilir.
- Oluşan lekeler daha kesindir böylece maddelerin ayrılması daha iyi gözlenebilir (49).

2.4.1.2.2. Kolon kromatografisi

Kolon kromatografisinde ise sabit faz ince bir kolonda bulunur ve mobil fazın basınçla beraber kolon boyunca bu sabit fazdan geçmesi sağlanır (45).

- Sıvı Kromatografisi (LC)

Bu yöntem hassasiyetinden dolayı analitik ayırma teknikleri içinde en yaygın kullanılanlardan biridir. Sıvı kromatografisinde cam kolon genellikle bir katı adsorban ile doldurulur ve numune, çözücü bir sıvı ile kolon boyunca ilerler. Ayrılma renkli, gözle görülür şekilde ise kolon çıkışından toplamak kolaydır. Aksi halde toplama işlemi fraksiyonlar halinde belirli hacimlerde yapılır ve enstrümantal yöntemlerle analiz edilir (45, 48).

Sıvı kromatografisinin ilk dönemlerinde dolgu maddesinin tanecik boyutunu küçülterek kolon verimliliğinin arttığı fark edilmiştir. 1960'ların sonuna doğru çapı 3-10 µm olan küçük tanecikli dolgu maddelerinin üretilmesiyle klasik yerçekimi basınçlı cam kolonlu sıvı kromatografisi yerine yüksek basınçla çalışan yüksek performanslı sıvı kromatografisi gibi cihazlara ihtiyaç duyulmuştur (45).

- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Bu yöntemde cam kolon yerine içinde çok küçük çaplı tanecikler bulunan paslanmaz çelik kolon kullanılır. Sıvı mobil faz bu kolondan yüksek basınç altında geçirilir. Kolondan çıkan maddeler detektöre ulaşır ve kalitatif ve kantitatif analizleri yapılır. Özellikle yüksek sıcaklıkta bozulabilen, kaynama sıcaklığı yüksek, polimerler gibi büyük molekül ağırlıklı maddelerin tayininde kullanılır (48).

- Gaz Kromatografisi (GC)

Mobil fazın gaz olduğu ayırma yöntemine gaz kromatografisi denir. Bu yöntemde ayırma her zaman bir kolonda gerçekleşir (47).

2.4.2. Gaz kromatografisi

Gaz kromatografisi, bir karışımda bulunan gazları veya bozunmadan gaz fazına geçebilen maddeleri ayırmak ve analizini yapmak için kullanılır. Gaz haline gelen numune bileşenlerinin, mobil gaz fazı ile bir kolonda bulunan sabit faz arasında dağılımları sonucu birbirlerinden ayrılmalarıyla gerçekleşir. Bu yöntemde mobil gaz fazı ile analizi yapılacak bileşenler arasında hiçbir etkileşim olmaz. Gazın tek işlevi, bileşenlerin kolon boyunca taşınmasıdır (45, 46).

Gaz kromatografisi sisteminde; numune enjeksiyon bölgesini, detektörü ve kolonu içine alan bir fırın bulunur. Enjeksiyon bölgesine verilen numune buharlaşarak mobil gaz faz ile kromatografi kolonuna taşınır. Numune bileşenleri genellikle buhar basınçlarına bağlı olarak kolonda ilerlerler. Mobil gaz fazın içinde kolondan çıkıp detektöre ulaşan numune bileşenleri mobil fazın özelliklerini değiştirmiş olurlar. Detektör bu değişmeyi algılar ve bunu elektronik bir sinyal haline dönüştürür ve kromatogram şeklinde kaydedilir (48).

Gaz kromatografisi kolay buharlaşabilen ve ısıya dayanıklı maddelerin analizinde tercih edilmektedir. Bu yöntem ilk defa 1950 yılında uçucu yağların analizinde Martin ve James tarafından kullanılmıştır. Daha sonra yöntemin gelişmesiyle ham petrolün içindeki maddelerin hızlı ve güvenilir bir şekilde ayrılması sağlanmıştır. (48).

Gaz kromatografisinin avantajları şunlardır;

- Bir numunedeki homolog, izomer ve kompleks bileşiklerin analizini yapabilir.
- Düşük konsantrasyonda (ppm ve ppb) maddelerin analizine uygun ve duyarlıdır.
- Az miktarlarda örnekle çalışılabilir (μL).
- Hızlı kalitatif ve kantitatif analiz yapabilir.
- Basit, güvenilir ve ucuz cihazlardır (48, 50).

Gaz kromatografisi sabit fazın yapısına göre ikiye ayrılır.

- Gaz – Katı Kromatografisi (GSC)

Gaz-katı kromatografisinde sabit faz olarak polar katı bir madde kullanılır ve yöntem adsorpsiyonla gerçekleşir. Katı faz ile numune bileşenleri arasındaki fiziksel etkileşimden dolayı bileşenler sabit fazda farklı sürelerde alıkonulur ve numunenin ayrılması gerçekleşir. Ancak polar bileşenlerin kısa sürelerle polar katı fazda alıkonulmaları piklerde kuyruklanmaya neden olabilir bu da analizi güçleştirir (46, 49).

- Gaz – Sıvı Kromatografisi (GLC)

Gaz kromatografisi denilince genel olarak gaz-sıvı kromatografisinden bahsedilmektedir. Gaz-sıvı kromatografisinde sıvı, kolonun iç yüzeyine bağlanır ve sabit faz görevi görür. Mobil gaz fazı bu fazın içinden rahatlıkla geçer. Bu kromatografi yönteminde dağılmadan yararlanılır. Analizi yapılan numune bileşenleri bu iki faz arasında özelliklerine göre denge kurularak dağılırlar (46, 49).

2.4.2.1. Kromatografik sistem

Kromatografik sistem taşıyıcı gazın basıncını ve akışını ayarlayan bölüm, enjeksiyon bölümü, kolon ve fırın, detektör ve data kaydedici bölümden oluşur (49).

2.4.2.1.1. Taşıyıcı gaz

Mobil faz taşıyıcı gaz olarak isimlendirilir ve görevi analizi yapılacak maddeyi kolon boyunca taşımaktır. Genellikle helyum kullanılır. Gaz kromatografisinde kullanılacak taşıyıcı gazda bulunması gereken özellikler; analit ve sabit fazla kimyasal reaksiyona girmemeli

(inert olmalı), gaz difüzyonu az olmalı, detektöre uygun olmalı, yüksek saflıkta olmalı, kolay ulaşılabilir ve ucuz olmalıdır (45, 51).

2.4.2.1.2. Enjeksiyon bölümü

Numune bir enjektör aracılığıyla cihaza verilir. Enjekte edilen numune, buharlaşma bölgesine gelir ve gaz fazına geçerek taşıyıcı gazla beraber kolona ilerler. Sisteme numune verilirken enjeksiyonun hızlı, tek seferde olması gereken miktarda yapılması önemlidir. Aksi halde elde edilen piklerde genişlemeye ve ayırımın iyi olmamasına sebep olur (45, 51).

Enjeksiyon, ayrılmalı (split) ve ayrımsız (splitless) olmak üzere iki şekilde yapılabilir. Ayrılmalı enjeksiyonda, ayrılan miktar haricinde kalan numune kolona ulaşmadan atılır. Ayrımsız enjeksiyonda ise enjekte edilen numunenin tamamı kolona girer (51).

2.4.2.1.3. Kolon

Gaz kromatografisinde enjekte edilen numune bileşenlerinin ayırımı kolonda gerçekleşir. Bu sebeple kolon ve içinde bulunan sabit fazın özellikleri önemlidir. Kolonda bulunan sabit fazın kaynama sıcaklığının yüksek olması ve sıcaklıkla bozulmaması gerekmektedir. Çalışmanın tekrarlanabilir olması için kolon sıcaklığı önemli bir değişkendir ve kontrol edilebilmelidir. Bu sebeple kolon termostatlı bir fırının içinde bulunur. Ayırma işleminin düzgün gerçekleşmesi için kolon seçimi önemlidir (45, 51).

2.4.2.1.4. Detektör

Detektör kolondan gelen taşıyıcı gaza göre elektronik bir sinyal oluşturur. Detektörün duyarlılığı, geniş bir konsantrasyon aralığında doğrusal çalışabilmesi, kararlılığının ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, güvenilir ve hızlı sonuç verebilmesi önemlidir (51).

Başlıca detektörler şunlardır:

- Alev İyonlaştırma Detektörü (FID)
- Termal İletkenlik Detektörü (TCD)
- Elektron Yakalama Detektörü (ECD)
- Kütle Seçici Detektör (MSD)

- Kütle Seçici Detektör (Kütle Spektrometresi – MS)

Kütle seçici detektör (kütle spektrometresi) madde bileşenlerinin gaz fazında, vakum altında iyonlarını oluşturur sonra da oluşan iyonları kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayırarak maddeleri tespit ve tayin etmeyi sağlamaktadır (51).

Kütle spektrometresinde gaz fazına geçirilen numune, iyon kaynağında iyonlaştırılırlar. Oluşan negatif veya pozitif iyonlar kütlelerine göre birbirlerinden ayrılırlar. Burada kütle m ve yük z 'dir. Oluşan iyonların m/z oranlarına göre o maddeye ait pikler ve kütle spektrumu oluşur. Kütle spektrumunda en yüksek m/z oranına sahip olan iyon genellikle molekül iyonudur. Elde edilen iyonların çoğunluğu tekli yüklü olduğu için, m/z değerleri, kütlelerini gösterir. (51, 52).

Kütle spektroskopisi, iyi ayrılmamış bileşenlerin analizinde de kullanılabilir. Kuyruklu bir pik birden çok madde içeriyorsa, pikin orta veya kuyruk kısmının kütle spektrumu farklı olabilir. Bu şekilde bir pikte birden çok tür olduğu anlaşılabilir ve bu türler teşhis edilebilir. Kütle spektrometresi maddelerin element yapılarının belirlenmesinde; inorganik, organik ve biyolojik moleküllerin yapılarını anlamada; karmaşık karışımların kalitatif ve kantitatif

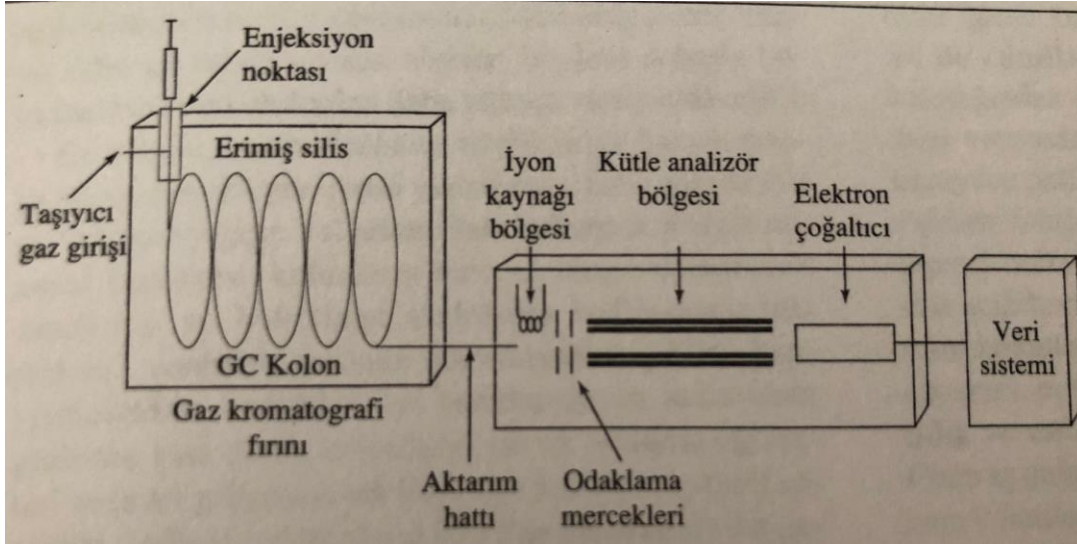
analizinde; bir numunedeki atomların izotop oranlarının bulunmasında oldukça sık kullanılan bir yöntemdir (45).

2.4.3. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)

Kütle seçici detektörün gaz kromatografi cihazında kullanılmasına kısaca Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) denir. GC-MS'de gaz kromatografisi bölümünde, analizi yapılacak numune gaz halinde bileşenlerine ayrılır. GC kolonundan farklı zamanlarda çıkan bileşenler kütle spektrometrisinin iyonlaştırma bölgesine gelir ve iyonları elde edilir. Ardından iyonlar m/z oranlarına göre ayrılır ve detektör tarafından kaydedilirler. Böylelikle kütle spektrumu elde edilir (51). GC-MS sisteminin şematik görünümü Şekil 2.8.'de verilmiştir.

Gaz kromatografisinde elde edilen veriler tek başlarına pikleri tespit etmek için yeterli olmaz ancak kütle spektrometresi sayesinde çok küçük miktarlarda numuneyle bilinmeyen maddelerin nitel ve nicel analizleri için bilgi sağlanabilir. Ayrıca gaz kromatografi sistemine kolaylıkla bağlanır (50).

Doğal veya biyolojik sistemlerdeki birçok maddenin analizinde GC-MS sistemi kullanılmaktadır. Gıdalardaki koku ve tat bileşenlerinin belirlenmesi, su analizleri, tıbbi tanı uygulamaları, ilaç etken maddelerinin ve metabolitlerinin analizi bu yöntemle yapılabilmektedir (45).



Şekil 2.8. GC-MS sisteminin şematik görünümü (45)

2.4.3.1. GC-MS'de kalitatif ve kantitatif analiz

2.4.3.1.1. Kalitatif (Nitel) Analiz

Kalitatif analizle elde edilen piklerin hangi maddeye ait olduğuna dair bilgi edinilebilir. Çalışılan numune ile standart maddenin alıkonma zamanı ve hacminden yararlanılarak analiz yapılabilir. Ayrıca maddelerin saf olup olmadıkları da kromatogramda pik olarak görülebilir. Böylelikle uygulanan yöntemin saflaştırma işleminde etkili olup olmadığı da görülmüş olur (45, 46).

- Alıkonma Zamanı: Numunenin cihaza enjekte edilmesiyle detektörde sinyalinin görünmesine kadar olan süreye denir. Bir maddenin numune içinde var olup olmadığını anlamada fikir verir (49).
- Alıkonma Hacmi: Bir maddenin sinyalinin detektörde görülene kadar kullanılan taşıyıcı gazın hacmine alıkonma hacmi denir (49).

2.4.3.1.2. *Kantitatif (Nicel) Analiz*

Kantitatif analiz, maddeden elde edilen pikin yüksekliğinin veya alanının bir standart ile karşılaştırılmasıyla yapılır. Pik alanı daha güvenilir sonuç vermesine rağmen alıkonma zamanı küçük olan maddeler için pik boyuna bakılır. Çünkü böyle maddelerin pikleri dar ve yüksektir ancak pik boyunun aksine iki maddenin alanlarının birbirine oranı değişmez. (45, 49).

- **Pik Boyu:** Pikin her iki tarafındaki taban çizgilerinin düz bir çizgi ile birleştirilmesi ve pikin tepe noktasına dikey mesafenin ölçülmesi ile elde edilir. Pik boyuna bakarken kolon sıcaklığı, maddenin akış hızı ve enjeksiyon hızına dikkat edilmelidir. (45).
- **Pik Alanı:** Pik boyu daha kolay ölçülmesine ve dar pikler için daha doğru sonuç vermesine rağmen miktar tayininde pik alanı daha güvenilir bir sonuç verir. Çünkü pik alanı, alıkonma süresi ve kolon verimi gibi değişikliklerden pik boyu gibi etkilenmez (45).
- **İç Standart (IS) Yöntemi:** İç standart yöntemi numunenin enjeksiyonunun sebep olabileceği belirsizlikleri önlediği için analizlerde güvenilir sonuç verir. Bunun için iç standart maddesi belirli hacimlerde numuneye ve standarda eklenir. Numunenin pik alanının iç standart pik alanına veya yüksekliğine oranı analiz için gerekli olan parametredir. Güvenilir sonuçlar için iç standart seçimi önemlidir. (45).

2.4.4. Gaz kromatografik analiz için numune hazırlanması

Numune hazırlık aşaması, çalışmada doğru sonuçları alabilmek için önemli bir basamaktır. Analizi yapılacak olan numune genellikle karışık bir matriks içinde bulunur ancak gaz kromatografisi kolonuna girecek numunenin olabildiğince saf olması gerekir (46). Numune hazırlanırken katılar uygun bir çözücüde çözülür, sıvılar için de etken maddeleri çekitleyecek yöntemler kullanılır.

2.4.4.1. Hidroliz – asit hidroliz / enzim hidroliz

İdrar ve kan numuneleri (tam kan, serum ve plazma), özellikle ilaç etken madde analizlerinde en yaygın kullanılan biyolojik örneklerdendir. Ancak özellikle idrar numunelerinden ilaç etken maddelerini daha kolay analiz edebilmek için hidroliz gerekebilir. Bunun için, asit veya enzim hidrolizi tercih edilebilir. Uygun hidroliz koşullarının seçilmesi, ilaca ve ilaç metabolitine bağlıdır. Sıcaklık, kullanılan enzim miktarı ve kaynağı, tamponun pH'sı ve süre hidrolizi etkileyen koşullardandır (53).

Enzim hidroliz, prosedürü uzatır ancak analiz için daha temiz numuneler elde etmeyi sağlar. Farklı enzim türleri mevcuttur, ancak en sık kullanılanlar arilsülfataz ile kombine edilmiş olan *E. coli* veya *Helix pomatia*'dan elde edilen β -glukuronidaz enzimidir. Hidroliz için kuvvetli bir asit de kullanılabilir ancak hedef bileşiğin parçalanabilmesi sebebiyle numuneyi takip etmeyi zorlaştırır, örnek olarak benzodiazepinlerde bu durum görülebilir (54).

2.4.4.2. Protein çöktürme

Protein çöktürme, proteinin çoğunun numuneden çıkarılmasını sağlayan basit bir numune hazırlama yöntemidir. Bunun için organik bir çözücü (genellikle asetonitril veya metanol) veya bir asit (genellikle perklorik veya trikloroasetik asit) kullanılır. Ardından santrifüj ile

protein kısım ayrılır ve üst kısım alınarak kromatografik analiz için hazırlanır. Sadece proteinler çıkartılmasına rağmen, kütle spektrometri analizlerinde matriks etkisine sebep olabilen diğer bileşikler kalır (55).

2.4.4.3. Çekitleme

2.4.4.3.1. Sıvı-sıvı çekitleme yöntemi (LLE)

Klasik sıvı sıvı çekitlemesi, analitin birbirine karışmayan iki sıvının içerisinde bir fazdan diğerine (sulu tampondan organik çözücüye) geçirilmesidir. Hızlı ve ucuz olmasına rağmen çok fazla çözücü kullanılması gerekmektedir (54).

2.4.4.3.2. Katı faz çekitleme yöntemi (SPE)

Katı faz çekitleme yönteminin amacı; analizi yapılacak maddenin yoğunlaştırılması böylece numune hazırlama sırasındaki kayıpların etkisinin azaltılması, numunede bulunan matriks bileşenlerinin uzaklaştırılarak kromatogramda iyi bir sonuç elde edilmesi ve etken maddenin kromatografik cihazla çalışılabilmesi için uygun bir çözücüye geçirilmesidir (56).

Yöntem matriks içinde bulunan analitin katı çekitleme fazı tarafından tutulmasıyla gerçekleşir. Katı fazda bulunan madde üç boyutlu polimerik bir maddedir ve materyalin por genişliği, sertliği ve yüzey alanı önemlidir (56).

Katı faz çekitlemesi 4 aşamada gerçekleşir:

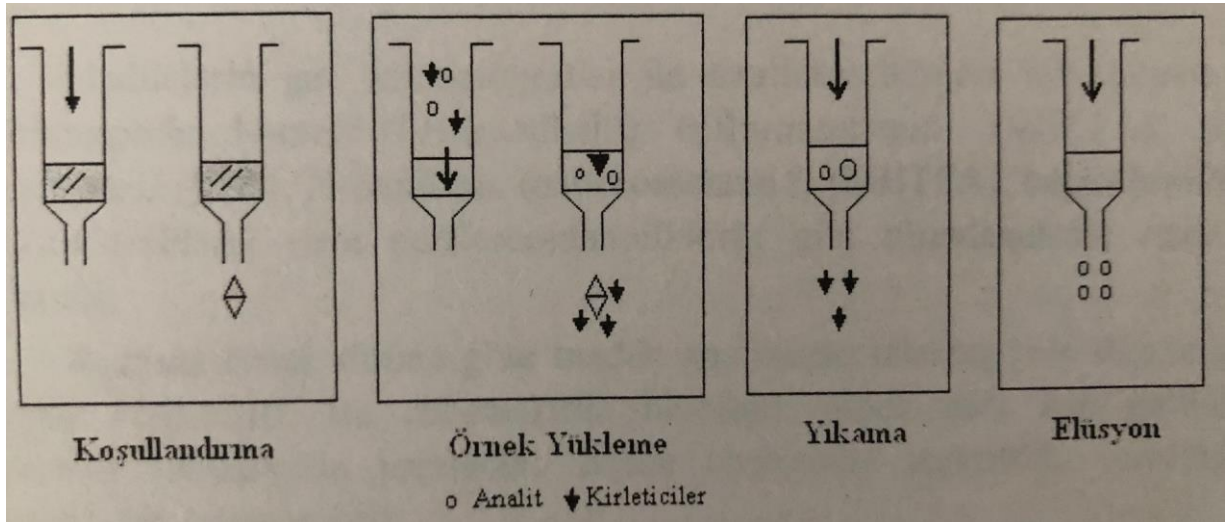
- a. **Şartlama:** SPE kartuşunun aktif hale gelebilmesi için bir çözücü yardımıyla ıslatılması gerekmektedir. Ardından kartuş kurumadan numune uygulanır.
- b. **Numunenin uygulanması:** Numunenin kartuştan geçirilmesidir.
- c. **Yıkama:** Matriks etkisine sebep olabilecek maddelerin en aza indirilmesi amaçlanmaktadır.

d. Elüsyon: Son aşamada analize hazır olan numunenin kartuştan uygun bir çözücüye toplanmasıdır. Elüsyon çok hızlı gerçekleşmemelidir (56).

SPE yönteminin çalışma sistemi Şekil 2.9.'da verilmiştir.

SPE yönteminin sıvı-sıvı çekitlemeye göre tercih edilmesinin birçok sebebi vardır. Bunlar;

- Çözücü tüketimi daha azdır ve numune daha çabuk kromatografik yöntemlere hazırlanır.
- Verim daha yüksektir ve yöntemin kesinliğe de daha yüksektir.
- Bu yöntemde katı faz için polar, hidrofobik veya etkileşimli maddeler adsorban olarak kullanılabilirken klasik sıvı sıvı çekitlemesinde daha sınırlıdır.
- Tüm kromatografik ve spektroskopik yöntemler için kullanılabilir.
- Bu yöntemle safsızlığa sebep olan matriks bileşenleri ayrılarak analitin tayin edilebilirlik hassasiyeti yükseltilir. Böylelikle analizler için gerekli konsantrasyon aralığı da sağlanmış olur (56).



Şekil 2.9. SPE yönteminin çalışması (15)

2.4.4.4. Türevlendirme

GC-MS analizlerinde maddelerin genellikle uçucu ve termal olarak kararlı olmaları gerekir. Bunun için gerektiğinde maddelerin uçucu ve termal olarak daha kararlı türevleri analiz için hazırlanır. Türevlendirme işlemi pik simetrisi, uçuculuk ve termal kararlılığı arttırırken kütle spektrometresi için de saptama ve seçicilik sınırını geliştirir ve maddenin daha kolay belirlenebilmesini sağlar (50, 52).

Türevlendirme reaksiyonlarının içinde en yaygın olanı silillemedir. Maddenin aktif hidrojen atomunun trimetilsilil (TMS) grubu ile değiştirilmesi ile gerçekleştirilir. N,O-bis (trimetilsilil) asetamid (BSA), N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroasetamid (BSTFA) ve trimetilklorosilan (TMCS) gibi farklı TMS gruplarından faydalanılabilir. Her bir TMS grubu, aktif hidrojen sayısına bağlı olarak analit kütlelerini arttırarak spektrometrede tespit edilmesini kolaylaştırır. Bir diğer benzer reaktif, trifluoroasetamid grubunu içeren bis(trimetilsilil)-trifluoroasetamid (BSTFA) maddesidir. Türevlendirmede çözücü olarak genellikle polar bir çözücü kullanılır ve tepkimeleri hızlandırmak için sıcaklıktan yararlanır (50, 52, 57).

2.4.5. Kromatografik Yöntemlerle Benzodiazepin Analizi

Benzodiazepinler, yaygın kullanımından ve istismarından, trafikteki etkilerinden ve diğer yan etkilerinden dolayı adli bilimlerin de konusudur. Bu nedenle bu ilaçların tayini ve uygulanacak analiz yöntemleri de önemlidir. Biyolojik materyalde benzodiazepinlerin tespiti ve analizi için çeşitli analitik teknikten yararlanılmıştır. Bunların içinde kromatografik yöntemler önemli bir yere sahiptir. Bunların yanında immunoassay, fluorimetrik ve kolorimetrik yöntemler gibi diğer yöntemlerden de faydalanılmaktadır. Ayrıca kan ve idrar örneklerinin dışında saç, ağız sıvısı, tırnak gibi alternatif örneklere ilaveten son yıllarda

parmak izi, kurumuş kan lekesi ve nefes gibi farklı örneklerle de çalışmalar yapılmaktadır (5).

Adamowicz ve Kala tarafından benzodiazepinlerin de içinde olduğu cinsel saldırı amacıyla kullanılan madde ve ilaçların idrarda çoklu analizinde tarama, tespit ve miktar tayini için GC-El-MS ile yöntem geliştirme çalışması yapılmıştır. Yöntem aynı zamanda kan örnekleri için ve içecekler gibi biyolojik materyal harici numuneler için de başarılı bulunmuştur (58). Açıkkol ve ark. tarafından yapılan, yine madde kullanımının sebep olduğu suçlar kapsamında, alkollü ve alkolsüz içeceklerde diazepam, alprazolam, kloanazepam, flunitrazepam ve ketamin için türevlendirme basamağı içermeyen bir GC-MS yöntemi geliştirilmiştir (4).

Inoue ve ark., tam kan numunelerinden benzodiazepin tayininde çekitleme için SPE, analizler için de GC-MS cihazından yararlanmışlardır (59). SPE ve GC-MS sisteminden yararlanılarak yapılan bir başka çalışmada ise farklı benzodiazepinlerin ve metabolitlerinin idrarda düşük dozda tayini yapılmıştır (60).

Nakamura ve ark., alprazolam, diazepam ve klonazepamın da içinde olduğu 22 farklı benzodiazepin ve metabolitinin SPE ve LC-MS/MS kullanılarak serumdan tayini için yöntem geliştirmişlerdir (61). Saito ve ark.'nın SPE ve LC/TOF-MS (Sıvı Kromatofrafisi-Uçuş zamanlı Kütle Spektrometresi) yöntemlerini kullanarak içinde alprazolam ve diazepamın da olduğu bazı benzodiazepinlerin analizi için geliştirilen yöntemde serum ve idrar numuneleriyle çalışılmıştır (62). Mazhar ve Binder serumdan benzodiazepin ve trisiklik antidepressanların analizi için SPE ve HPLC sistemlerinden yararlanarak yöntem geliştirmişlerdir (63).

2.4.6. Alkol Analizi

Kanda, idrarda ve nefeste alkol miktarının saptanması; kişinin alkol alıp almadığını ve alınma zamanını belirlemede yardımcı olur. Biyolojik materyalde kullanılan yöntemler, enzimatik, gaz kromatografik ve otomatik yöntemler olarak sınıflandırılabilir. Pratik olması sebebiyle trafikte solunum havasında alkol konsantrasyonu, elektrokimyasal sensörleri olan basit bir alkol ölçme aletiyle (alkolmetre) belirlenmektedir. Gaz kromatografisi yöntemi daha hassas ve spesifik sonuç verir. Özellikle Head Space/GC-MS ile etil alkolün miktar tayini çok daha iyi yapılabilir (15).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan referans standart maddelere ve kimyasal maddelere ait bilgiler Tablo II'deki gibidir.

Tablo II. Çalışmada kullanılan referans standart kimyasal maddelerin isimleri ve markaları

Ürün adı	Markası
Diazepam (1g/mL MeOH'de)	Lipomed
Klonazepam (1g/mL MeOH'de)	Lipomed
Alprazolam (1g/mL MeOH'de)	Lipomed
n-docosane	Sigma
Enzim (β -glukuronidaz / arilsulfataz)	Merck
BSTFA + 1% TMCS	Supelco
Metanol	Merck
İzopropanol	Merck
Etil Asetat	Merck
Asetonitril	Merck
n-bütanol	Merck
Etil Alkol	Merck
Asetik Asit	Merck
Sodyum Asetat Trihidrat	Merck

3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Gereçler

Çalışmada kullanılan analitik sistemler, küçük laboratuvar aletleri ve gereçlere ait bilgiler Tablo III'deki gibidir.

Tablo III. Çalışmada kullanılan cihaz ve gereçlerin isimleri ve markaları

Gaz Kromatografisi	Agilent 7820A GC
Kütle Spektrometresi	Agilent 5977E MS
Head Space GC-MS	HP 6890 GC
Hewlett Packard 5973 MS	
Agilent 7694E Üst Boşluklu Örnekleyici (Head Space Sampler)	
SPE Düzeneği	
SPE Kartuşları (3mL, 60mg)	Oasis HLB
Vorteks	Isolab
Santrifüj	Hettcih Universal 320R
Etüv	Termal
Su Banyosu	Nüve BM30
pH metre	Thermo Orion 3Star
Elektronik Hassas Terazi	Precisa XB220A
Falkon Tüp (15, 50 mL)	Isolab
Balon Joje	Isolab
Cam Vial	Agilent
Pipet Ucu	Isolab

3.3. Örnek Toplanması

Bu çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi İlaç Dışı Klinik Araştırmaları Etik kurulu tarafından 22.07.2015 tarihinde yapılan toplantıda 242 sayılı karar ile onaylanmıştır (Ek 1).

Bu çalışmada Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Acil Tıp Kliniği'ne yaralamalı trafik kazası sonucu başvuran ve "Asgari Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu"nu (Ek 2) imzalayarak çalışmaya katılmayı kabul eden sürücülerden biyolojik örnekler toplandı. Ağustos 2016 – Kasım 2017 tarihleri arasında toplamda 44 sürücünden elde edilen 37 tam kan numunesi ve 40 serum numunesi İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp Enstitüsü, Adli Toksikoloji Laboratuvarı'nda çalışıldı. Tam kan numuneleri EDTA'lı mor kapaklı tüplere (2 mL) ve serum numuneleri de sarı kapaklı kuru tüplere (2 mL) alındı. Toplanan numuneler analiz edilinceye kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.4. Çalışmaya Katılan Sürücülere Ait Bilgiler

"Katılımcı Bilgi Formu"ndan (Ek 3) elde edilen sürücü bilgileri Tablo IV ve Tablo V'de verilmiştir.

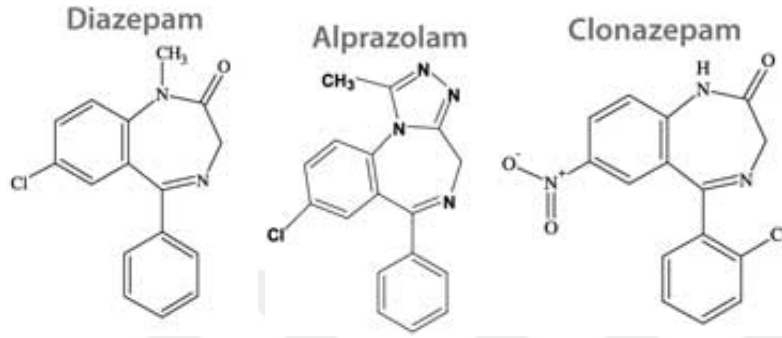
Tablo IV. Çalışmaya katılan sürücülerin genel bilgileri

Sürücü sayısı	44
Cinsiyet	Kadın: 2 (%4,6) Erkek: 42 (%94,49)
Yaş ortalaması	32,4
Yaş aralığı	16-63
Motor kazası sayısı	15 (%34,1)
Araç İçi Trafik Kazası (AİTK) sayısı	29 (%65,9)

Tablo V. Çalışmaya katılan sürücülerin ayrıntılı bilgileri

Örnek No	Tam Kan	Serum	Kaza Bilgisi	Cinsiyet	Yaş
1	VAR	VAR	Motor kazası	ERKEK	24
2	VAR	VAR	Motor kazası	ERKEK	21
3	VAR	VAR	Motor kazası	ERKEK	19
4	VAR	VAR	Motor kazası	ERKEK	33
5	VAR	VAR	AİTK	KADIN	35
6	VAR	VAR	AİTK	KADIN	26
7	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	49
8	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	39
9	VAR	YOK	AİTK	ERKEK	52
10	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	63
11	VAR	VAR	Motor kazası	ERKEK	16
12	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	30
13	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	37
14	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	43
15	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	52
16	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	22
17	VAR	VAR	Motor kazası	ERKEK	21
18	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	21
19	VAR	VAR	Motor kazası	ERKEK	26
20	VAR	YOK	Motor kazası	ERKEK	43
21	VAR	YOK	AİTK	ERKEK	25
22	VAR	YOK	AİTK	ERKEK	51
23	VAR	VAR	Motor kazası	ERKEK	21
24	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	44
25	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	30
26	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	23
27	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	22
28	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	24
29	YOK	VAR	AİTK	ERKEK	36
30	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	24
31	VAR	VAR	Motor kazası	ERKEK	25
32	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	19
33	VAR	VAR	Motor kazası	ERKEK	39
34	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	19
35	VAR	VAR	Motor kazası	ERKEK	27
36	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	36
37	YOK	VAR	Motor kazası	ERKEK	22
38	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	31
39	VAR	VAR	AİTK	ERKEK	53
40	YOK	VAR	AİTK	ERKEK	51
41	YOK	VAR	Motor kazası	ERKEK	19
42	YOK	VAR	AİTK	ERKEK	43
43	YOK	VAR	Motor kazası	ERKEK	42
44	YOK	VAR	AİTK	ERKEK	29

Çalışmada sürücülerden toplanan serum örneklerinde benzodiazepin grubu bazı etken maddeler arandı. Benzodiazepin analizinde GC-MS sisteminden yararlanılarak etken madde olarak diazepam (DIA), alprazolam (ALP) ve klonazepam (KLO)'ın analizleri yapıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Diazepam, alprazolam ve klonazepamın kimyasal yapıları

Tam kan örneklerinde ise Üst Boşluklu (Head Space) GC-MS sistemi kullanılarak alkol analizi yapıldı.

3.5. Benzodiazepin Analizi

3.5.1. Benzodiazepin analizinde kullanılan çözeltiler

İç Standart (IS) Çözeltisinin Hazırlanması

Öncelikle 15 mg n-docosane 50 mL MeOH'de çözdürülerek 300 µg/mL konsantrasyonda ana stok çözeltisi hazırlandı.

Daha sonra 10 mL hacimli balon jodede konsantrasyonu 5 µg/mL olan n-docosane IS çözeltisi hazırlandı. Bunun için ana stok çözeltiden 166,66 µL alındı ve 10 mL'ye MeOH ile tamamlandı.

0.1M NaCH₃COO.3H₂O (Sodyum Asetat Trihidrat) Çözeltisinin Hazırlanması

1,3608g NaCH₃COO.3H₂O 100 mL hacimli balon jodede distile suda çözdürülerek 100 mL'ye tamamlandı.

0.1M CH₃COOH (Asetik Asit) Çözeltisinin Hazırlanması

0,572 mL CH₃COOH balon jodede distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0.1M pH 5.5. Asetat Tamponunun Hazırlanması

85,5 mL NaCH₃COO.3H₂O çözeltisi ile 14,5 mL CH₃COOH çözeltisi kullanılarak 100 mL'lik balon jodede hazırlandı.

Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması

Kalibrasyon çalışması için öncelikle alprazolam, klonazepam ve diazepamın referans standartlarından (1 mg/mL konsantrasyonda) ara stok çözeltisi hazırlandı.

Ara stok çözeltisi; referans standart çözeltiden alınan 125 µL diazepam, 250 µL klonazepam, 500 µL alprazolam, 125 µL MeOH ile toplamda 1mL'ye tamamlanarak elde edildi.

Hazırlanan ara stok çözelti seyreltilerek her bir kalibrasyon çözeltisi hazırlandı. Ayrıca IS olarak 300 µg/mL'lik n-docosane ana stok çözeltisinden 16.7 µL alınarak tüm kalibrasyon çözeltilerine son konsantrasyon 5 µg/mL olacak şekilde eklendi.

Ara stok çözeltisi kullanılarak Tablo VI'de detayları verilen kalibrasyon noktaları hazırlandı.

Tablo VI. Kalibrasyon noktalarının konsantrasyonları (µg/mL)

Kalibrasyon noktalarının kodları	Klonazepam-TMS	Alprazolam	Diazepam	n-docosane
CAL 0	-	-	-	5
CAL1	2,5	5	1,25	5
CAL2	5	10	2,5	5
CAL3	10	20	5	5
CAL4	15	30	7,5	5
CAL5	25	50	12,5	5
CAL6	30	60	15	5
CAL7	40	80	20	5
CAL8	50	100	25	5
CAL9	60	120	30	5

Bunların dışında klonazepam için türevlendirilmeden de kalibrasyon eğrisi çizildi. Bunun için 1 mg/mL klonazepam referans standardı seyreltilerek ara stok çözeltisi hazırlandı. Ara stok çözeltisi için 250 µL klonazepam ve 750 µL MeOH kullanıldı.

Daha sonra ara stok çözelti kullanılarak diğer kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. IS olarak 300 µg/mL'lik n-docosane ana stok çözeltisinden 16.7 µL alınarak tüm kalibrasyon çözeltilerine son konsantrasyon 5 µg/mL olacak şekilde eklendi. Kalibrasyon noktaları Tablo VII'da verilen konsantrasyonlarda hazırlandı.

Tablo VII. Klonazepam'ın kalibrasyon noktalarının konsantrasyonları ($\mu\text{g/mL}$)

Kalibrasyon noktalarının kodları	Klonazepam	n-docosane
CAL 0	-	5
CAL1	10	5
CAL2	15	5
CAL3	20	5
CAL4	30	5
CAL5	50	5
CAL6	60	5
CAL7	40	5

3.5.2. Benzodiazepin analizi için örnek hazırlama basamakları ve optimizasyonu (58, 62, 63)

Serum örneğinin hazırlanması

Kuru tüpün içerisinde bulunan kan örneği 5000 rpm hızda 10 dk. boyunca santrifüj edildi.

Elde edilen 900 μL serum örneği 900 μL asetonitril (1:1) ile karıştırılarak 5000 rpm'de 15 dk. boyunca santrifüj edilerek içerisindeki proteinler çöktürüldü.

Ardından üst faz alınarak, içine 2.5 mL 0.1 M asetat tamponu (pH:5.5) ve 50 μL enzim β – glukuronidaz/arilsulfataz eklenerek 55°C'de 60 dk su banyosunda inkübe edildi.

Katı faz çekitleme Yönteminin Uygulanması

Şartlama: Oasis HLB katı faz çekitleme kartuşları 2 mL metanol ve 2 mL ultra saf su ile şartlandırıldı.

Yükleme: Örnek düşük vakum altında kartuştan geçirildi.

Yıkama ve Kurutma: Kartuş 2 mL ultra saf su ve asetonytril karışımı (H₂O: ACN) (80:20) ile yıkandı ve kartuş yüksek vakum altında 5 dk boyunca kurutuldu.

Elüsyon: Analitler 0.8 mL metanol ve 0.8 mL metanol-izopropanol (3:1) karışımı ile elüe edildi.

Serum örneklerinin GC-MS ile analizi

Elüat, tam kuruluğa kadar azot altında uçurularak konsantrasyonu 5µg/mL n-docosane çözültisi olan MeOH ile 200 µL'ye tamamlandı.

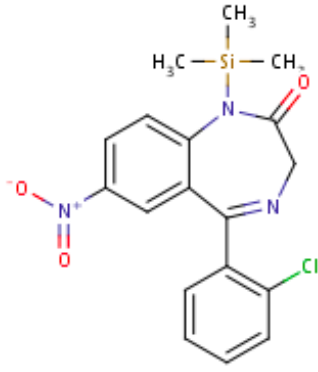
Ardından oto örnekleyici ile 3 µL hacimde GC/MS sistemine enjekte edildi.

Klonazepam etken maddesi için türevlendirme prosedürü

Klonazepam etken madde analizi için türevlendirme prosedüründen yararlanıldı. Bunun için katı faz çekitleme işlemi sonucu elde edilen elüat 37°C'de tam kuruluğa kadar azot altında uçuruldu.

Elde edilen numune 50 µL BSTFA + 1%TMCS ve 40µL etil asetat/asetonytril (1:1) karışımı ile 70°C'de 40 dk. boyunca türevlendirme işlemi için muamele edildi.

Ardından tekrar azot altında uçurulduktan sonra 90 µL IS eklenerek oto örnekleyici ile 3 µL hacimde GC/MS sistemine enjekte edildi. Türevlendirilmiş klonazepamın kimyasal yapısı Şekil 3.2.'de gösterildi.



Şekil 3.2. Klonazepam-TMS'in kimyasal yapısı

3.5.3. GC-MS ile benzodiazepin analizi

Bu çalışma için Şekil 3.3.'de gösterilen Agilent 7820A Gaz Kromatografisi, Agilent 5977E Kütle Spektrometresi cihazı kullanıldı.



Şekil 3.3. Benzodiazepin analizinin yapıldığı GC-MS cihazının görüntüsü

GC parametreleri

Toplam analiz süresi: 19.5dk.

Kolon: HP-5ms 30m*250 μ m*0.25 μ m

Solvent delay: 4.8 dk.

Başlangıç sıcaklığı: 160°C

Bekleme süresi: 1dk.

160°C'de 1 dakika bekledikten sonra cihaz dakikada 30°C artarak 265°C'ye ulaşır ve bu sıcaklıkta 15 dakika boyunca analiz devam eder.

Enjeksiyon Hacmi: 3 μ L

Split oranı 8:1

MS parametreleri

Kütle detektörü, tarama (scan) modunda 50-600 m/z iyon aralığında çalışır.

Etken maddeleri belirlemek ve ayırt etmek için (detection and identification) tarama ve SIM (Seçilmiş iyon izleme) modundan birlikte yararlanılmıştır.

SIM modunda izlenen iyonlar (m/z):

n-docosane (IS)	57, 71, 85
Diazepam	256, 283
Klonazepam-TMS	387, 352, 306
Klonazepam	280, 314, 234
Alprazolam	279, 204, 308

3.6. Benzodiazepin Analizinin Optimizasyonu

3.6.1. Doğrusallık çalışmaları

Diazepam, alprazolam, klonazepam ve klonazepam-TMS için kalibrasyon eğrileri Tablo 3.5 ve Tablo 3.6'da verilen konsantrasyonlarda 6 ayrı set olarak hazırlandı ve GC-MS sisteminde analiz edildi.

3.6.2. Geri kazanım çalışmaları

Geri kazanım hesaplamaları için analit içermeyen 900 µL boş serum örneğine kalibrasyon çözeltilerinden düşük ve yüksek iki farklı konsantrasyon noktası seçilerek (klonazepam için 15 ve 40 µg/mL, diazepam için 7,5 ve 20 µg/mL ve alprazolam için 30 ve 80 µg/mL konsantrasyonda olacak şekilde) örnek hazırlama aşamasının en başında eklendi ve daha sonra 3.5.2. bölümündeki prosedüre göre çözümlenerek GC-MS'de analiz edildi ve miktar tayini yapıldı. Geri kazanım hesaplamaları için her konsantrasyon noktası 6 kez tekrarlandı, analiz edildi ve hesaplamaları yapıldı. %Geri kazanım ve %RSD hesaplamaları aşağıda verilen formüller kullanılarak yapıldı.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = (c_1 / c_0) * 100$$

c_0 : Kalibrasyon eğrisinden seçilen ve boş serum örneğine eklenen madde konsantrasyonu

c_1 : Benzodiazepin prosedürü uygulandıktan sonra miktar tayini sonucu bulunan madde konsantrasyonu

$$\% \text{RSD} = (\sigma / c_{\text{ort}}) * 100$$

σ : Geri kazanım hesaplamaları için tekrarlı çalışılan kalibrasyon noktasının standart sapması

c_{ort} : Benzodiazepin prosedürü uygulandıktan sonra bulunan madde konsantrasyonunun tekrar çalışmasının ortalaması

3.6.3. LOD ve LOQ hesaplamaları

LOD ve LOQ hesaplamaları aşağıda gösterilen şekilde yapıldı (64).

$$\text{LOD} = 3.3 \times \sigma / \text{Eğim}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \sigma / \text{Eğim}$$

σ = Kalibrasyon eğrisinin en düşük konsantrasyonun tekrarlı çalışmasından elde edilen standart sapma

Eğim = Kalibrasyon eğrisinin eğimi

3.7. Alkol Analizi

3.7.1. Alkol analizinde kullanılan çözeltiler

IS çözeltilisinin hazırlanması

IS olarak kullanılan n-butanolden 20 g/L konsantrasyonunda stok çözelti hazırlandı. 0,246 mL n-butanol 10 mL'lik balon jodede distile su ile tamamlandı.

Daha sonra stok çözelti kullanılarak son konsantrasyon 1,6 g/L olacak şekilde n-butanol IS çözeltilisi hazırlandı. 0,8 mL stok çözeltiliden alınarak distile su ile balon jodede 10 mL'ye tamamlandı.

3.7.2. Alkol analizi için örnek hazırlanması ve yöntemin uygulanması

Alkol analizi için İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Adli Tıp Enstitüsü Toksikoloji Laboratuvarının rutin alkol analiz prosedürü uygulandı.

1mL tam kanın içerisine 500 μ L n-butanol IS çözeltilisi eklenerek analiz edildi.

3.7.3. Üst Boşluklu (Head space) GC-MS analiz parametreleri

Bu çalışma için Şekil 3.4.'de gösterilen HP 6890 Gaz Kromatografisi ve Hewlett Packard 5973 Kütle Spektrometresi ile Agilent 7694E üst boşluklu (head space-HS) örnekleyici sistem kullanıldı.



Şekil 3.4. Alkol analizinin yapıldığı HS/GC-MS cihazının görüntüsü

HS Parametreleri

Vial sıcaklığı: 80°C

Loop sıcaklığı: 90°C

Transfer hattı: 100°C

GC Cycle Time: 4 dk.

Vial denge süresi: 4dk.

Basınç süresi: 0,20 dk.

Loop dolum süresi: 0,20 dk.

Loop denge süresi: 0,05 dk.

Enjeksiyon süresi: 0,5 dk.

Çalkalama tipi, süresi: Yüksek, 2dk

GC-MS Parametreleri

Toplam analiz süresi 3.5 dk.

Kolon: HP- 5MS 30m*250µm*0.25µm

Başlangıç sıcaklığı: 37°C

Bekleme süresi: 2 dk.

37°C'de 2 dakika bekledikten sonra cihaz dakikada 2°C artarak 40°C'ye ulaşır.

Split oranı 50:1

Analiz modu: SIM

SIM modunda izlenen iyonlar (m/z):

Etanol 31, 46

n-butanol (IS) 31, 41, 56

3.8. Sürücü Numunelerinin Analizi

Sürücülerden alınan 40 serum numunesi diazepam, klonazepam ve alprazolam analizi için, 37 tam kan numunesi de alkol analizi için 3.5. ve 3.7.'de anlatılan analiz yöntemlerine ve cihaz parametrelerine göre çalışıldı.

4. BULGULAR

Kullanılan sistem parametrelerine göre serumda benzodiazepin analizi için alprazolam, diazepam, klonazepam, klonazepam-TMS ve IS (n-docosane) ile kanda alkol analizi için etanol ve IS (n-butanol)'ün alıkonma süreleri, standart sapmaları ve başlıca m/z parametreleri aşağıdaki tablolarda (Tablo VIII ve IX) verildi.

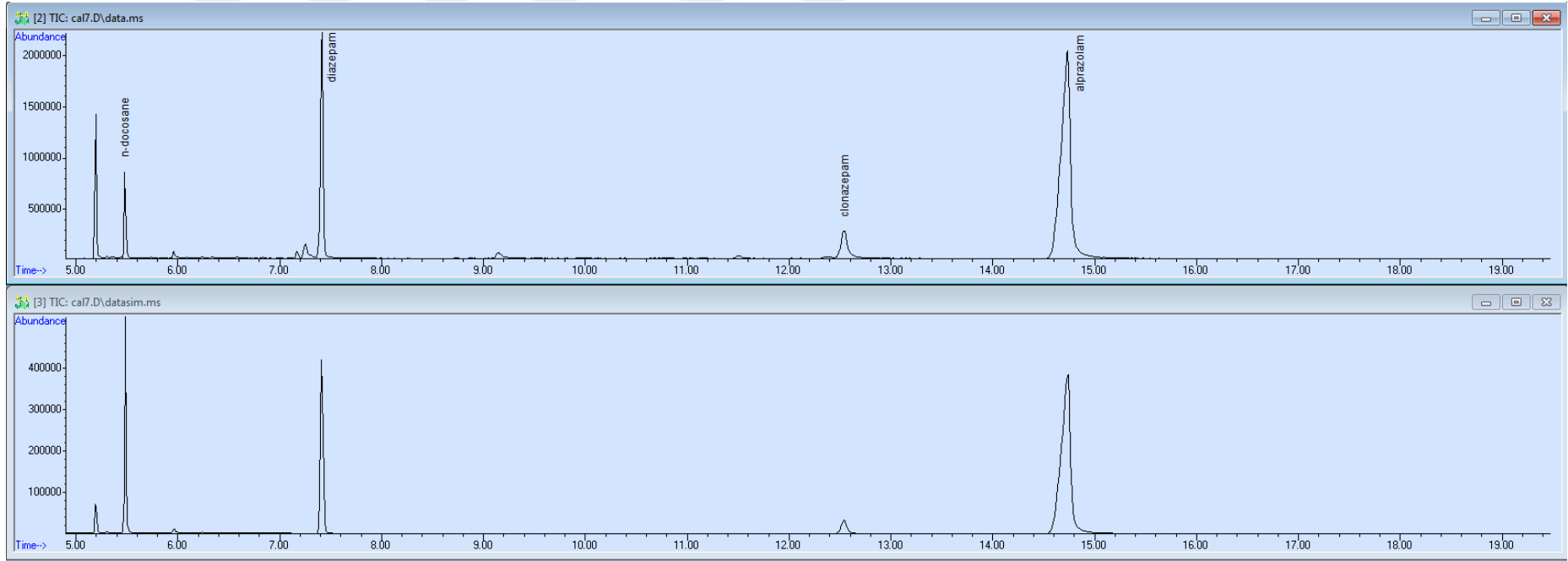
Tablo VIII. Maddelerin alıkonma süreleri (dk.) ve standart sapmaları

Madde	Alıkonma Süreleri (dk.)	Standart Sapma (n=6)
n-docosane (IS)	5.482	± 0,003
Diazepam	7.414	± 0,005
Klonazepam-TMS	9.413	± 0,004
Klonazepam	12.540	± 0,011
Alprazolam	14.637	± 0,054
Etanol	1.567	± 0,036
n-butanol (IS)	2.736	± 0,064

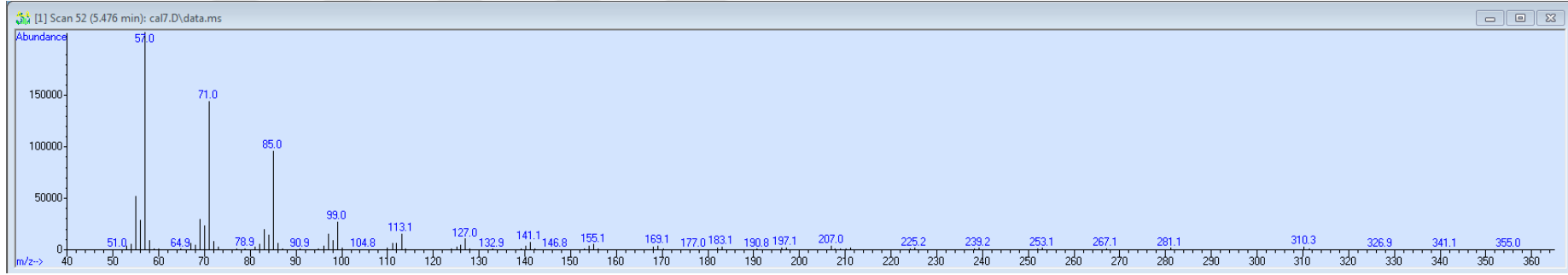
Tablo IX. Maddelerin MS spektrumundaki başlıca iyonları (m/z)

n-docosane (IS)	57, 71, 85
Diazepam	256, 283
Klonazepam-TMS	387, 352, 306
Klonazepam	280, 314, 234
Alprazolam	279, 204, 308
Etanol	31, 46
n-butanol (IS)	31, 41, 56

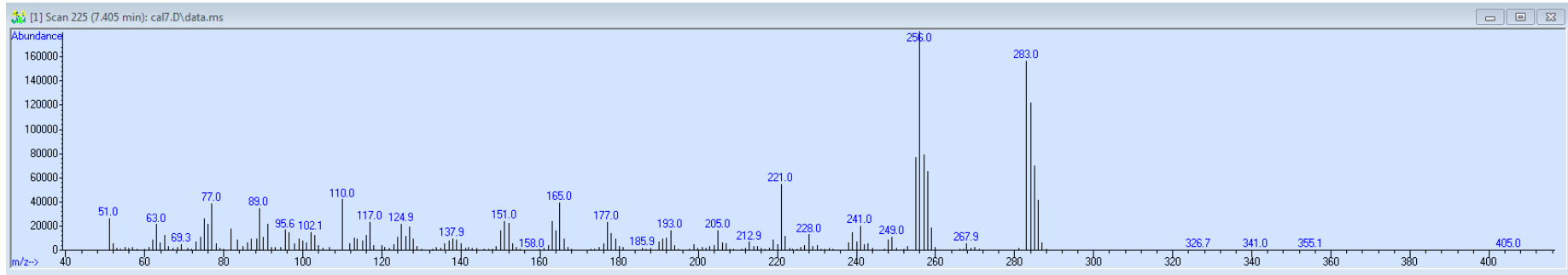
Konsantrasyonu belirli kalibrasyon noktasının kromatogramları ve analiz edilen maddelerin kütle spektrumları Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.'da verildi. Şekillerde üstte görülen kromatogram GC-MS sisteminde yapılan tarama programının sonucunu, alta görülen kromatogram ise SIM (seçilmiş iyon izleme) yönteminin sonucunu göstermektedir.



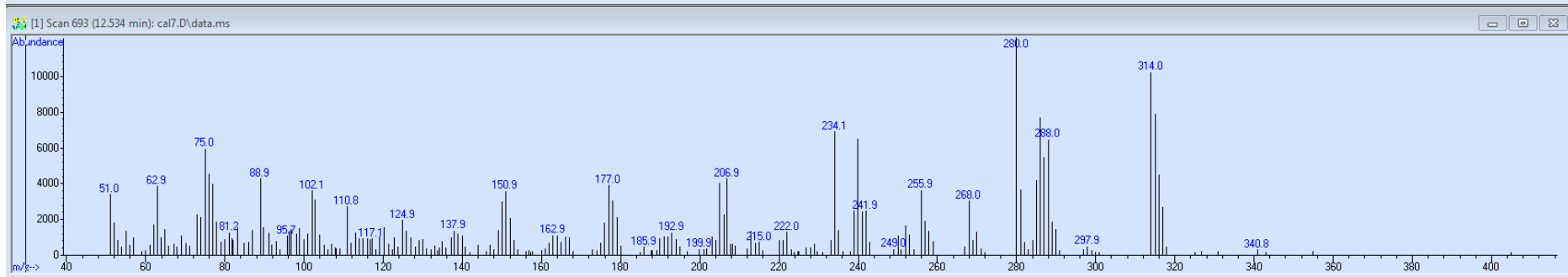
Şekil 4.1. n-docosane (5µg/mL), Diazepam (20µg/mL), Klonazepam (40µg/mL) ve Alprazolam (80µg/mL) konsantrasyonlarının kromatogramları (tarama ve SIM yöntemleri ile)



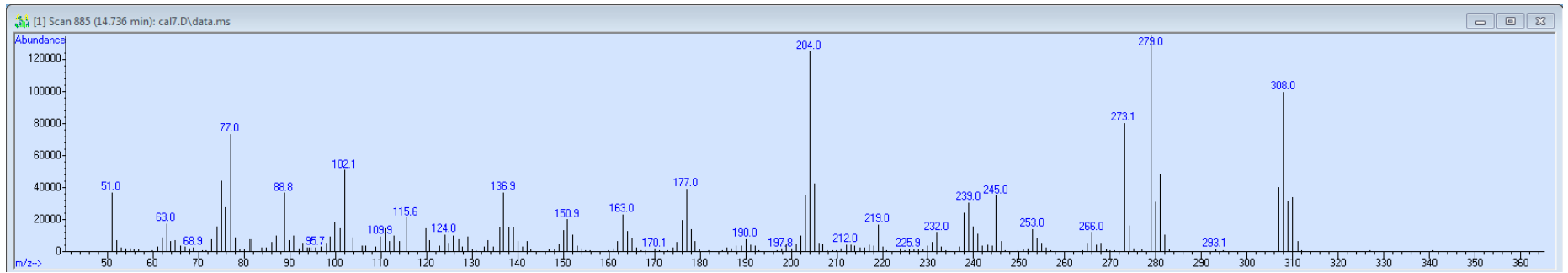
Şekil 4.2. n-docosane'a ait kütle spektrumu



Şekil 4.3. Diazepama ait kütle spektrumu

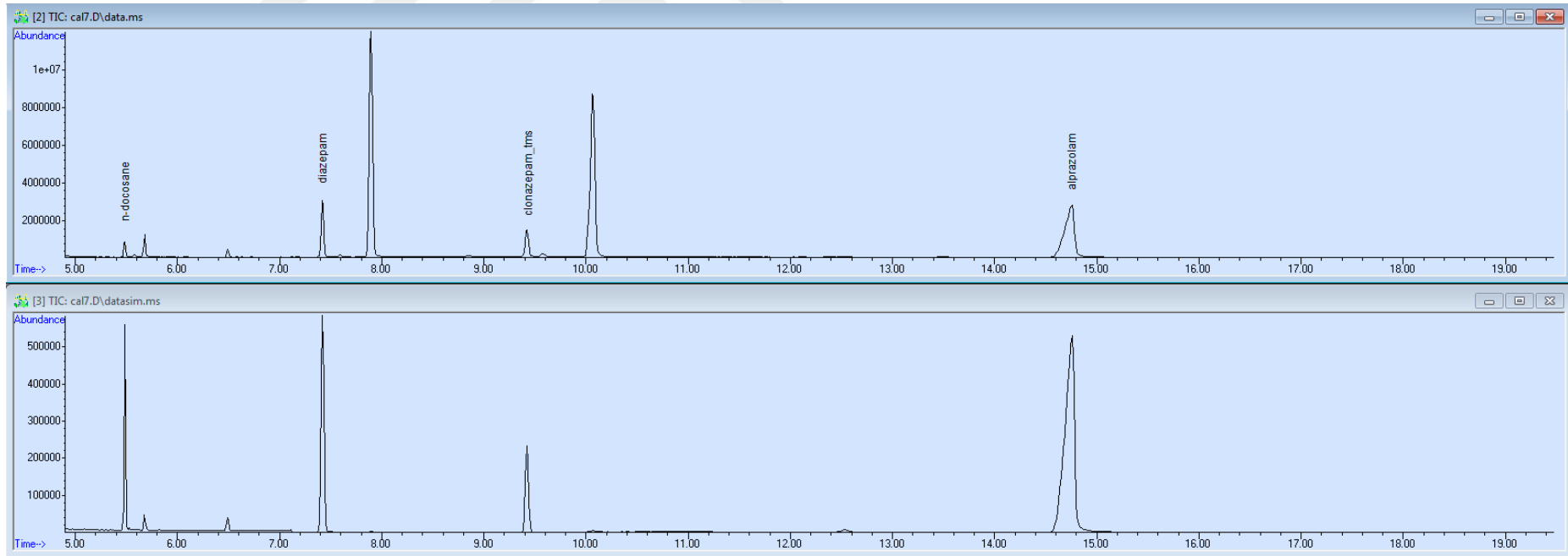


Şekil 4.4. Klonazepama ait kütle spektrumu

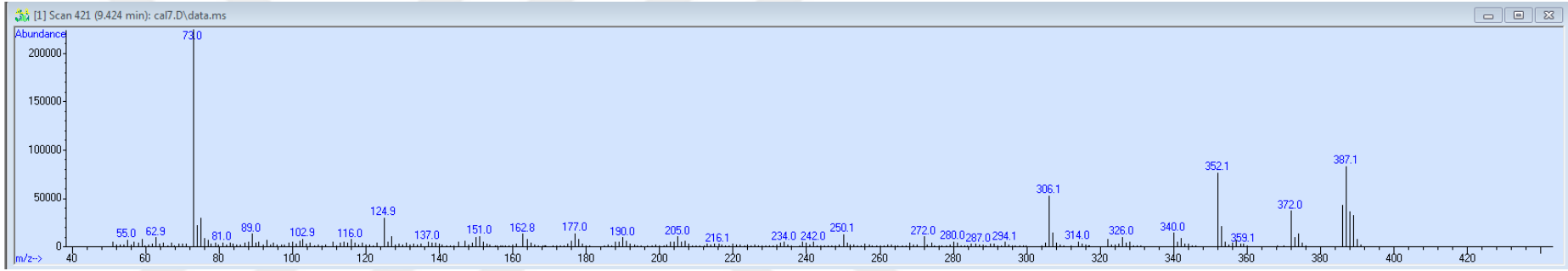


Şekil 4.5. Alprazolama ait kütle spektrumu

Konsantrasyonu belirli ve klonazepam için türevlendirme prosedürü uygulanan bir kalibrasyon noktasının kromatogramı ve klonazepam-TMS'in kütle spektrumu Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.'da verildi.

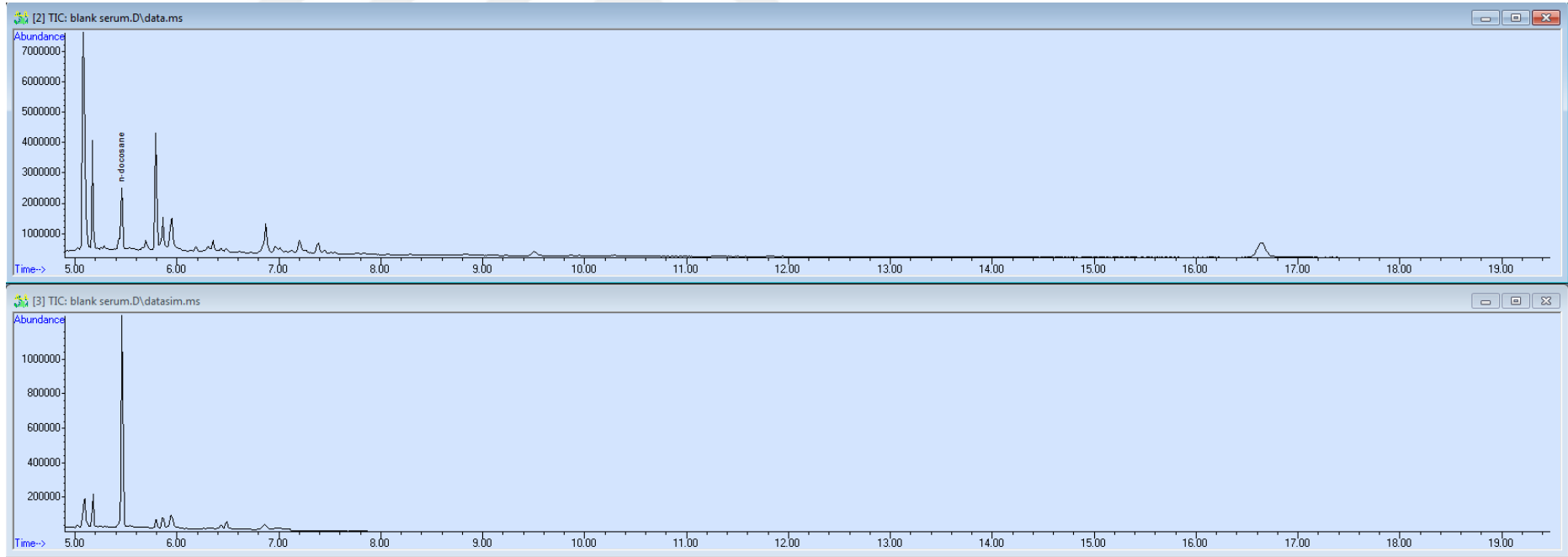


Şekil 4.6. n-docosane (5 µg/mL), Diazepam (20 µg/mL), Klonazepam-TMS (40 µg/mL) ve Alprazolam (80 µg/mL) konsantrasyonlarının kromatogramı (tarama ve SIM yöntemleri ile)



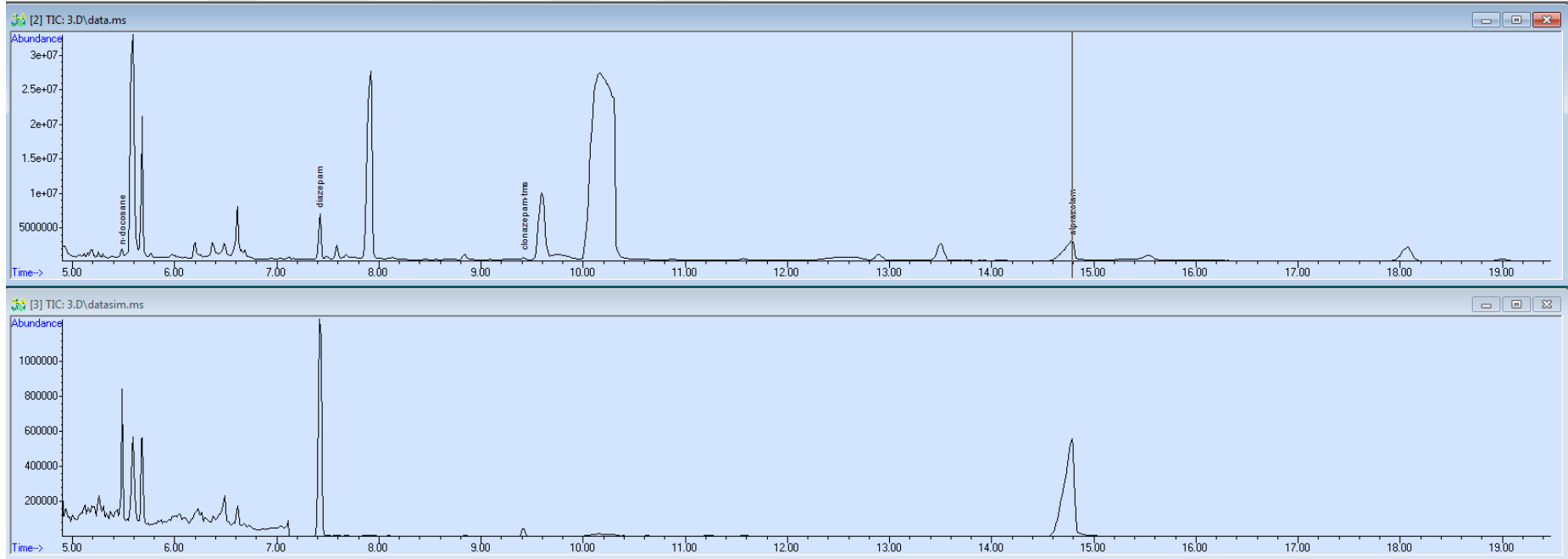
Şekil 4.7. Klonazepam-TMS'e kütle spektrumu

Sadece iç standart eklenmiş olan ve çalışmada yer alan analitlerden herhangi birini içermeyen boş serum örneğine ait kromatogram Şekil 4.8.'de verildi.

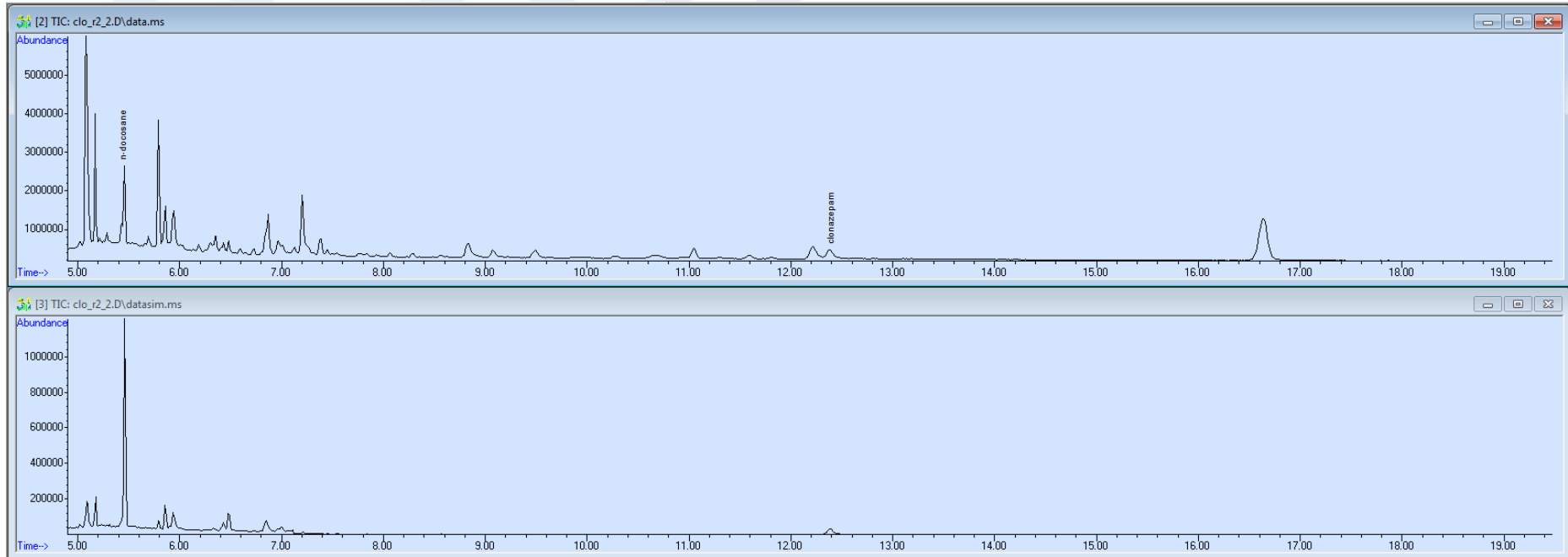


Şekil 4.8. Analit içermeyen boş serum kromatogramının görüntüsü (tarama ve SIM yöntemleri ile)

Analiz edilecek maddelerin boş serum örneğine katılmasıyla elde edilen kromatogramları Şekil 4.9. ve Şekil 4.10.'da verildi.

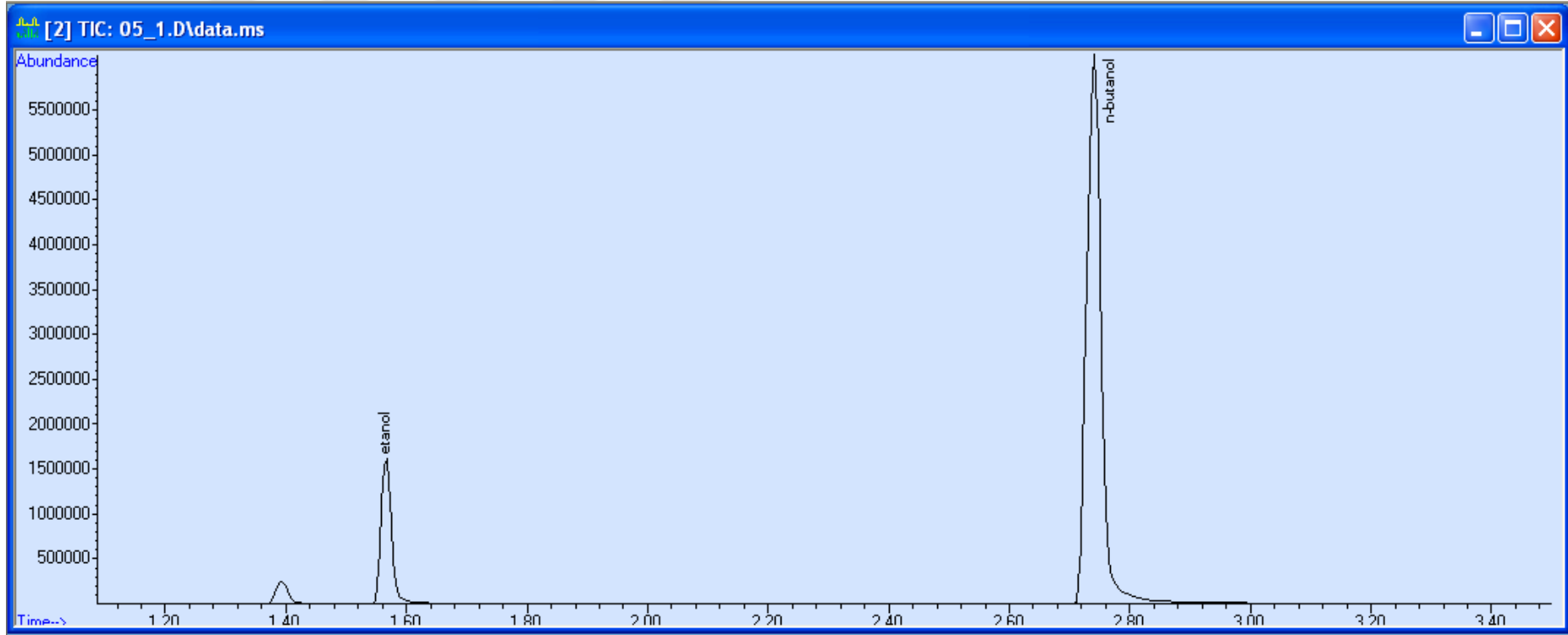


Şekil 4.9. Katım yapılmış ve türevlendirilmiş serum kromatogramı (40 µg/mL diazepam, 160 µg/mL alprazolam, 80 µg/mL klonazepam-TMS (tarama ve SIM yöntemleri ile)

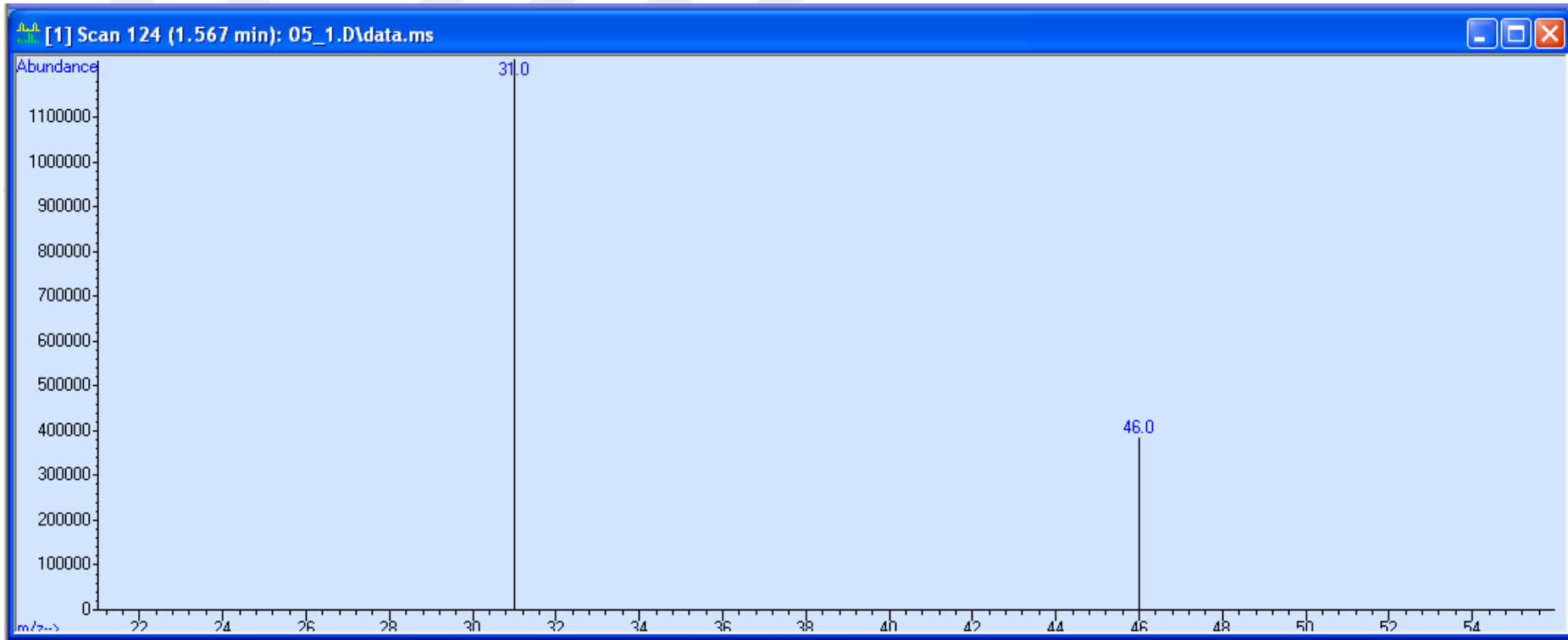


Şekil 4.10. Katım yapılmış ve türevlendirilmemiş serum kromatogramı (40µg/mL klonazepam) (tarama ve SIM yöntemleri)

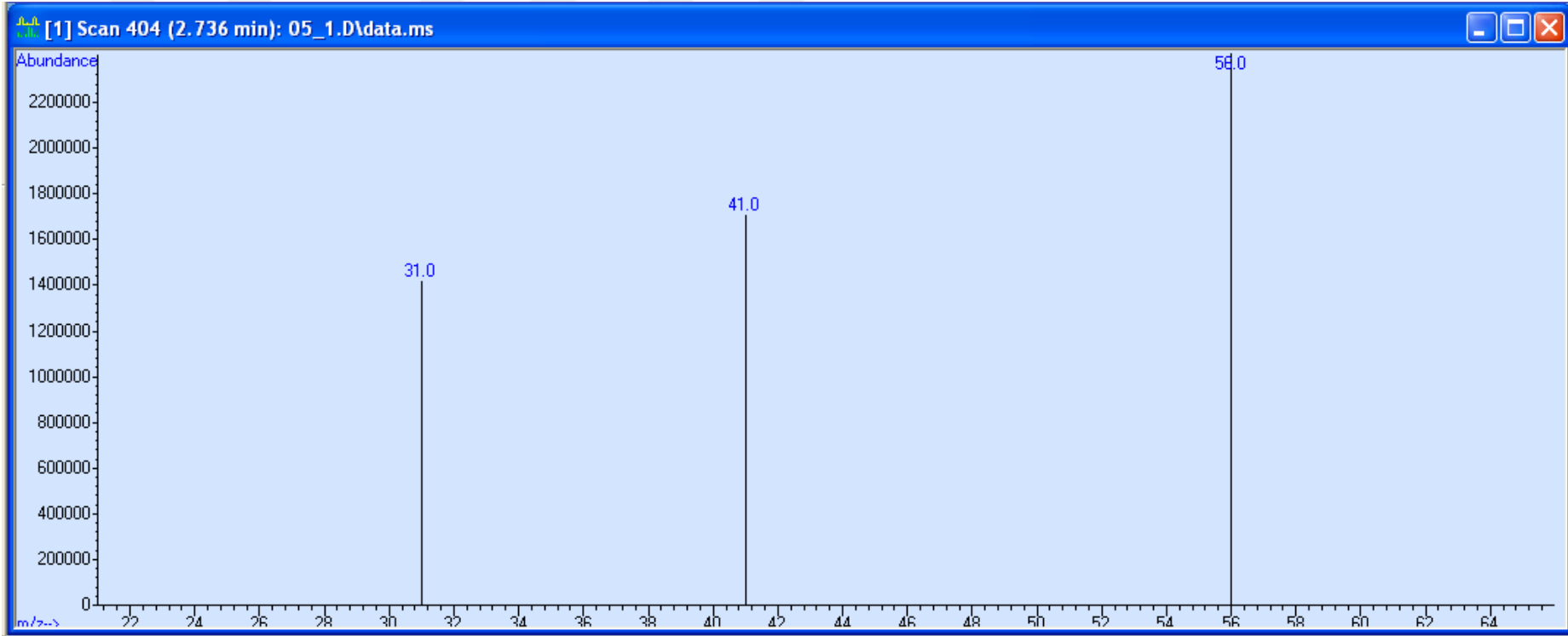
Etanola ait kromatogram ve etanol ve n-butanolün kütle spektrumları Şekil 4.11., Şekil 4.12. ve Şekil 4.13.'de verildi.



Şekil 4.11. 0,5g/L konsantrasyondaki etanolün kromatogramı



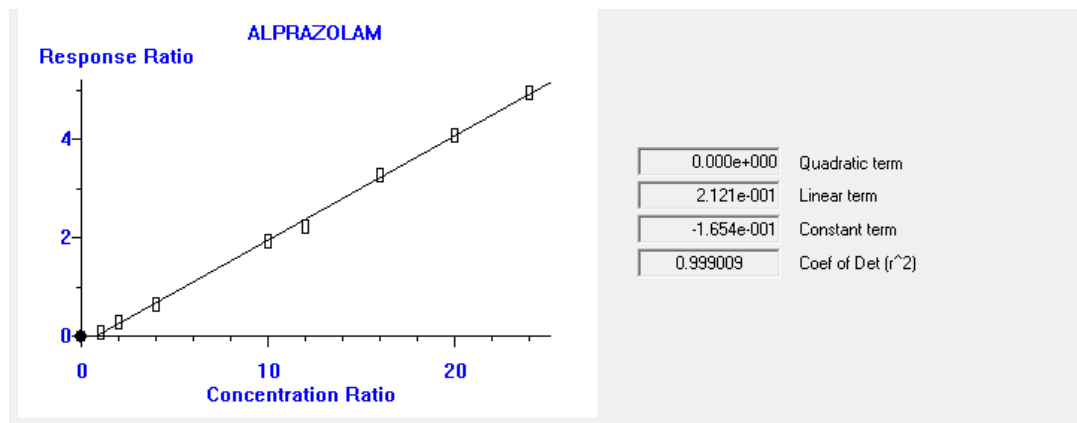
Şekil 4.12. Etanola ait kütle spektrumu



Şekil 4.13. n-butanole ait kütle spektrumu

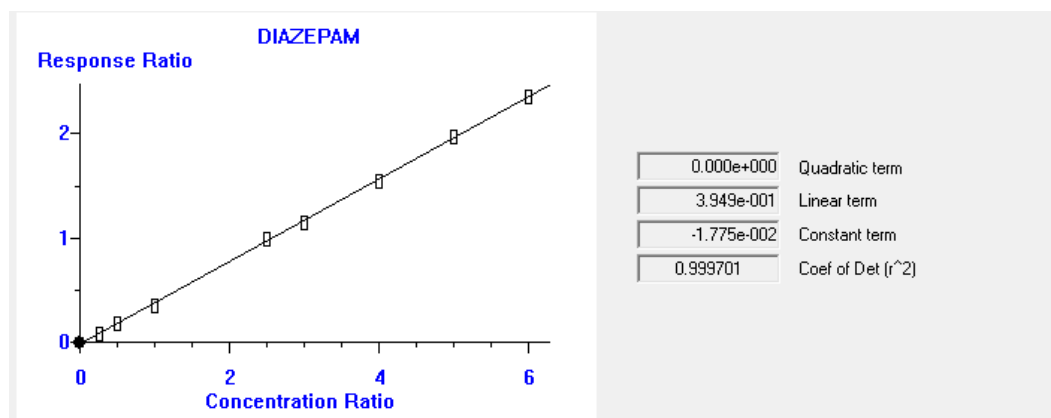
Alprazolam, diazepam, klonazepam, klonazepam-TMS ve etanole ait kalibrasyon eğrileri

Alprazolam için kalibrasyon aralığı 5-120 µg/mL olarak belirlendi. Bu aralıkta korelasyon katsayısı $R^2 = 0.9990$ ve kalibrasyon eğrisinin denklemi de $y = 0,2121x - 0,1654$ olarak hesaplandı. Kalibrasyon eğrisi Şekil 4.14.'de verildi. Burada, **response ratio**; etken maddenin detektör cevabının IS'nın detektör cevabına oranını, **concentration ratio**; etken maddenin konsantrasyonunun IS'in konsantrasyonuna oranını ifade etmektedir.



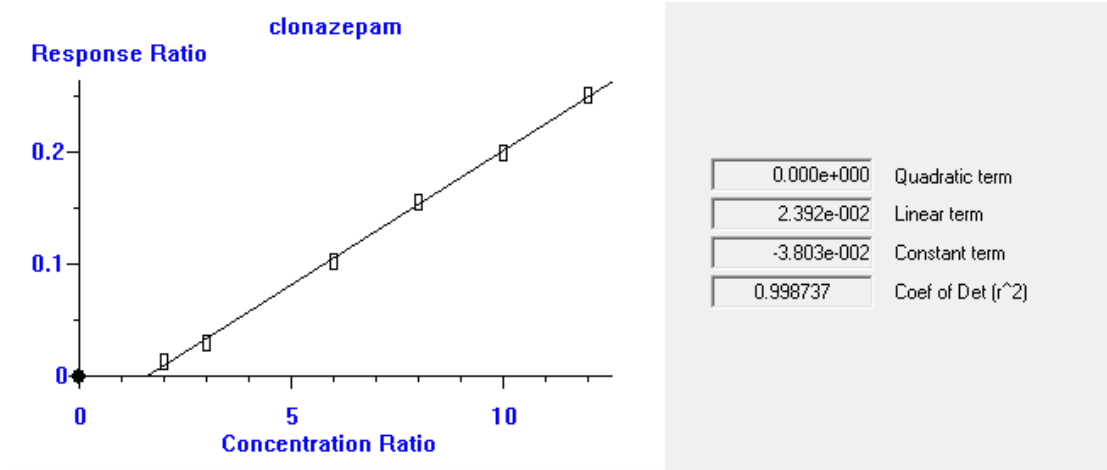
Şekil 4.14. Alprazolama ait kalibrasyon eğrisi

Diazepam için kalibrasyon aralığı 1.25-30 µg/mL olarak belirlendi. Bu aralıkta korelasyon katsayısı $R^2 = 0.9997$ ve kalibrasyon eğrisinin denklemi de $y = 0,3949x - 0,0178$ olarak hesaplandı. Kalibrasyon eğrisi Şekil 4.15.'de verildi.



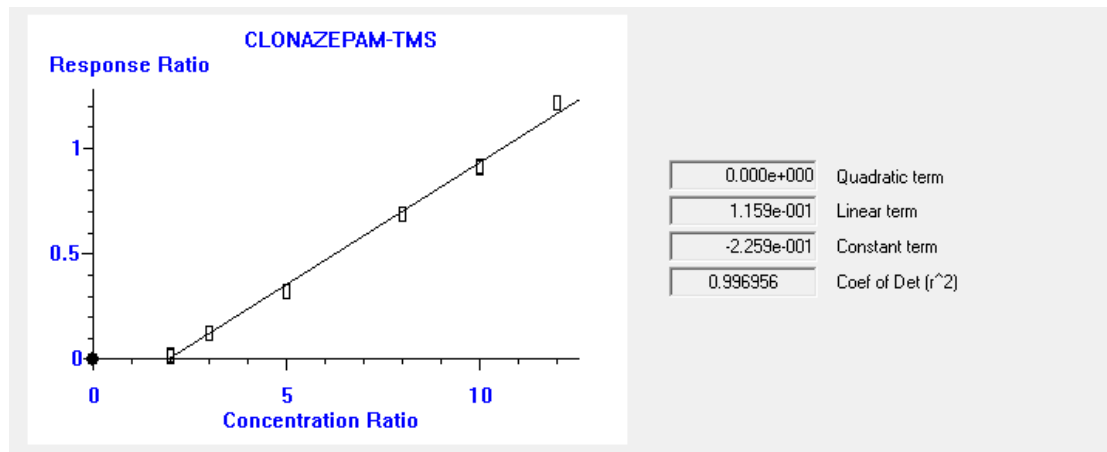
Şekil 4.15. Diazepama ait kalibrasyon eğrisi

Klonazepam için kalibrasyon aralığı 10-60 µg/mL olarak belirlendi. Bu aralıkta korelasyon katsayısı $R^2= 0.9987$ ve kalibrasyon eğrisinin denklemi de $y=0,02392x-0,03803$ olarak hesaplandı ve kalibrasyon eğrisi Şekil 4.16.'da verildi.



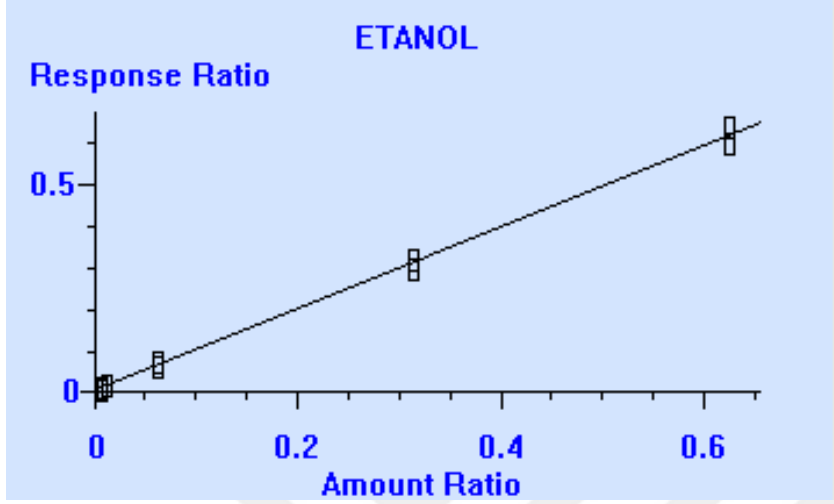
Şekil 4.16. Klonazepama ait kalibrasyon eğrisi

Klonazepam-TMS için kalibrasyon aralığı 10-60 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu aralıkta korelasyon katsayısı $R^2= 0.9970$ ve kalibrasyon eğrisinin denklemi de $y=0,1159x-0,2259$ olarak hesaplandı. Kalibrasyon eğrisi Şekil 4.17.'de verildi.



Şekil 4.17. Klonazepam-TMS'e ait kalibrasyon eğrisi

Etanol için kalibrasyon eğrisinin aralığı 0,01-1g/L, bu aralıkta korelasyon katsayısı $R^2=0.9976$ ve kalibrasyon eğrisinin denklemi de $y=0,975x-0,00412$ olarak kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi Şekil 4.18.'de verildi.



Şekil 4.18. Etanole ait kalibrasyon eğrisi

LOD, LOQ sonuçları

LOD ve LOQ hesaplamaları için kalibrasyon eğrisinin doğrusal aralığının en düşük noktasının standart sapmalarından yararlanıldı. LOD ve LOQ sonuçları Tablo X.'de verildi.

Tablo X. Diazepam, alprazolam, klonazepam, klonazepam-TMS ve alkol için LOD ve LOQ sonuçları ($\mu\text{g/mL}$).

	Diazepam	Alprazolam	Klonazepam	Klonazepam-TMS	Alkol
LOD	0.396	0.887	3.472	4.885	20
LOQ	1.201	2.688	10.521	14.802	59

Geri kazanım sonuçları

Geri kazanım hesaplamaları serum örneğine kalibrasyon eğrisinin doğrusal aralığından düşük ve yüksek 2 farklı konsantrasyon noktası seçilerek tekrarlı bir şekilde yapıldı. % Geri kazanım ve % RSD sonuçları Tablo XI'de gösterildi.

Tablo XI. Diazepam, alprazolam ve klonazepam için %Geri kazanım ve %RSD sonuçları

	DIAZEPAM		ALPRAZOLAM		KLONAZEPAM	
Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	7,5	20	30	80	15	40
Ortalama ($\mu\text{g/mL}$)	5,75	14,66	22,36	59,27	11,19	28,09
Standart Sapma	0,47	1,15	1,85	5,64	1,05	2,87
%RSD	8,17	7,85	8,27	9,52	9,38	10,23
%Geri Kazanım	76,67%	73,30%	74,53%	74,08%	74,60%	70,23%

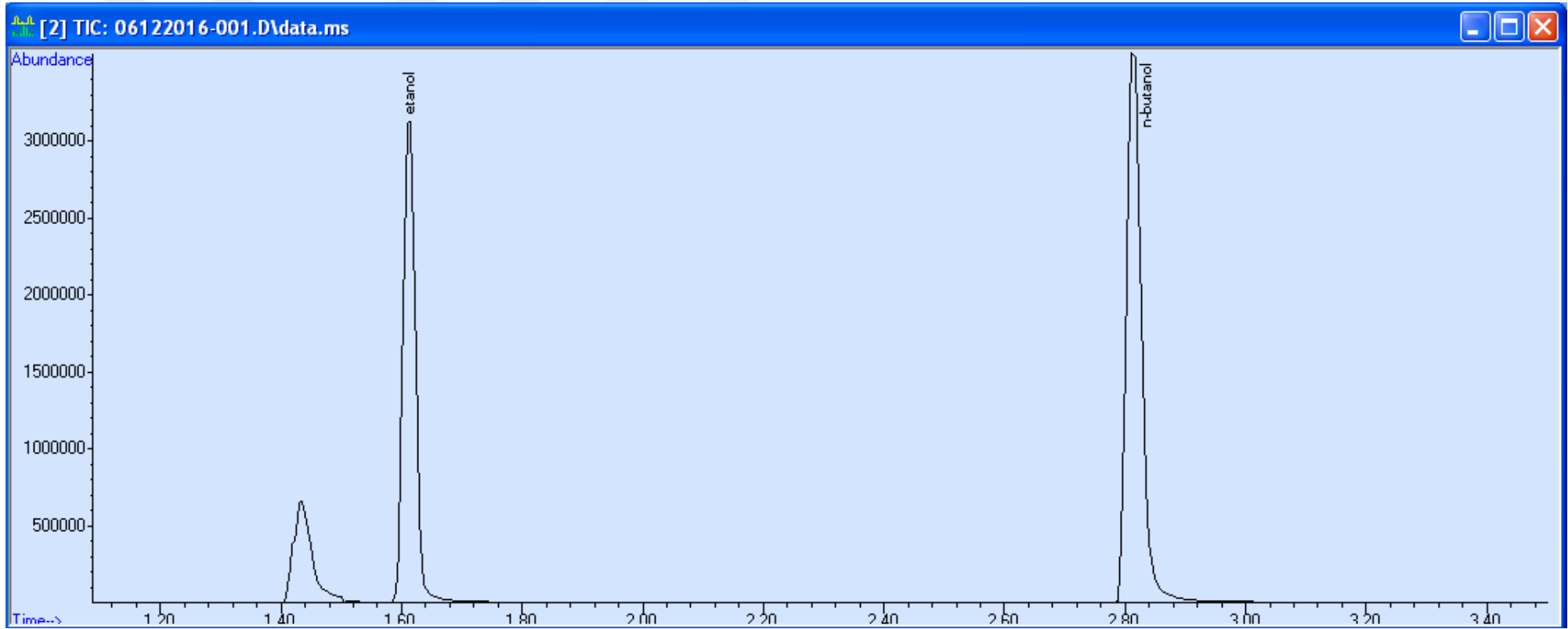
Hasta örneklerinin analizi

Ağustos 2016 – Kasım 2017 tarihleri arasında Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Acil Tıp Kliniği'ne yaralamalı trafik kazası sonucu başvuran sürücülerden toplanan 37 tam kan ve 40 serum numunesi 3.5. ve 3.6. bölümlerinde anlatıldığı gibi çalışıldı.

Yapılan deneyler sonucunda toplam 44 sürücüden toplanan 40 serum numunesinde diazepam, klonazepam ve alprazolam etken maddelerine rastlanmadı. Alkol analizi sonucunda ise, 37 tam kan numunesinde toplam 6 sürücünün (% 16.22) kanında alkole rastlandı. Analiz sonuçları Tablo XII'da ve alkol analizi pozitif sonuç veren bir örnek kromatogramı Şekil 4.19.'da gösterildi.

Tablo XII. Pozitif çıkan alkol analiz sonuçları

Örnek No	Alkol
6	184 mg/dL
9	192 mg/dL
10	12 mg/dL
13	205 mg/dL
25	348 mg/dL
33	2 mg/dL



Şekil 4.19. 205 mg/dL konsantrasyonda alkol içeren sürücü örneğine ait alkol analizi kromatogramı

5. TARTIŞMA

Benzodiazepinler anksiyolitik, sedatif, hipnotik ve antiepileptik etkilerinden dolayı tüm dünyada yaygın olarak reçetelendirilen ilaçlardır (5).

Depresyon şikayetleri ve benzodiazepin kullanımı konulu bir araştırmada, hastaların yaklaşık üçte birine benzodiazepin reçete edildiği saptanmıştır (65). Ülkemizde 2011 yılında Isparta’da yapılan bir çalışmada ise benzodiazepinlerin reçetelendirme sıklığı %2.06 bulunmuştur. Sıklıkla tercih edilen benzodiazepinler ise alprazolam (%76.4), klonazepam (%11.4) ve diazepam (%6.8)’dir (66).

Bachhuber ve ark., ABD’nin büyük şehirlerinde yaptıkları bir araştırmada ise benzodiazepinlerin amacı dışında kullanımları sebebiyle acil servislere yapılan başvuruların 2004-2011 yılları arasında arttığı görülmüştür (35). İstanbul’da lise öğrencileriyle yapılan bir çalışmada benzodiazepinlerin; nargile, alkol, sigara ve uçuşu maddelerden sonra en az bir kere kullanıldığı sonucu ortaya çıkmıştır (37).

5237 sayılı kanunda “üretimi resmi makamların iznine veya satışı yetkili tabip tarafından düzenlenen reçeteye bağlı olan ve uyuşturucu veya uyarıcı madde etkisi doğuran maddeler” kapsamında 2008-2009 yıllarında Adli Tıp Kurumu’nda değerlendirilen dosyalarda en sık karşılaşılan ilaç grubunun benzodiazepinler (%82.3) olduğu görülmüştür (36). Bu ilaçların medikal kullanımlarının yanında kötüye kullanımlarının da yaygın olması, uyuşukluk hali, algı ve hafıza zayıflamaları gibi yan etkileri cinsel saldırı dahil birçok adli vakanın parçası olmalarına sebep olur. Özellikle alkol, yasadışı maddeler ve diğer medikal ilaçlarla birlikte kullanımları yan etkilerini artırır. Bu sebeplerle de analizleri ve analizleri için seçilecek yöntemin güvenilir ve seçici olması önem kazanmaktadır. Benzodiazepinlerin biyolojik

materyalden, atık sudan ve içeceklerden tayini için çeşitli analitik yöntemlere başvurulmuştur (4, 5).

Adamowicz ve Kala tarafından çeşitli benzodiazepinlerin de içinde olduğu cinsel saldırı amacıyla kullanılan 128 farklı madde ve ilacın idrardan yan yana analizi için tarama, tespit ve miktar tayini yöntemi geliştirilmiş, SPE ve GC-El-MS yöntemlerinden yararlanılmıştır. Tercih edilen yöntem kan örnekleri ve içecekler gibi biyolojik olmayan örnekler için de uygulanabilir olduğu ifade edilmiştir (58). Inoue ve ark., tam kan numunelerinden benzodiazepin tayininde SPE yöntemi için Oasis HLB kartuşlarından yararlanmış ve analizler türevlendirme basamağı gerçekleştirilmeden GC-MS cihazı ile analiz gerçekleştirmişlerdir (59). Nakamura ve ark., alprazolam, diazepam ve klonazepamın da olduğu 22 farklı benzodiazepin ve metabolitinin Oasis HLB katı faz çekitleme kartuşları ve LC-MS/MS kullanılarak serumdan tayini için yöntem geliştirmişlerdir (61). Borrey ve ark. tarafından geliştirilen SPE ve GC-MS yönteminden yararlanılarak yapılan bir başka çalışmada ise farklı benzodiazepinlerin ve metabolitlerinin idrarda düşük dozda tayini yapılmıştır SPE aşamasında ise yıkama basamağında su ve asetonitrilin beraber kullanılmasının matriks etkisini azalttığı ifade edilmiştir (60). Saito ve ark.'nın SPDE ve LC/TOF-MS yöntemlerini kullanarak içinde alprazolam ve diazepamın da olduğu bazı benzodiazepinlerin analizi için geliştirilen yöntemde serum ve idrar numuneleriyle çalışılmıştır. Söz konusu çalışmanın örnek hazırlama aşamasında serum numunesi için protein çöktürme ve enzim hidroliz basamaklarından yararlanılmıştır. (62). Mazhar ve Binder'in SPE ve HPLC yöntemlerinden kullanarak serumdan benzodiazepin (diazepam ve alprazolamın dahil olduğu) ve trisiklik antidepressanların analizi için geliştirdiği yöntemde katı faz çekitleme aşamasında matriks etkisini en aza düşürmek için yıkama basamağında asetonitrilin de kullanılması tavsiye edilmiştir (63). Yukarıda bahsi geçen çalışmalardan elde edilen validasyon bulguları bu çalışmanın sonuçları ile karşılaştırılmak üzere Tablo XIII'de ayrıntılı şekilde verilmiştir.

Tablo XIII. Kromatografik yöntemler kullanarak biyolojik materyalde benzodiazepin analizi yapılan çalışmaların karşılaştırmalı bulguları

Yöntem	r^2	Doğrusal Aralık	LOD	LOQ	Geri Kazanım		RSD %	
					Konsantrasyonu	%		
Adamowicz ve Kala, 2010								
SPE, GC-EI-MS idrar	Diazepam	0.9659	0.4-50 µg/mL	0.3µg/mL	0.4µg/mL	-	16	-
	Alprazolam	0.9831	0.3-50 µg/mL	0.2µg/mL	0.3µg/mL	-	67	-
	Klonazepam-TMS	0.9984	20-50 µg/mL	12µg/mL	20µg/mL	-	16	-
Inoue ve ark., 2000								
SPE, GC-MS tam kan	Diazepam	>0.995	5-500ng/mL	1ng/mL	-	10 ng/mL	95.9	6.0
						200 ng/mL	68.7	4.9
	Alprazolam	>0.995	5-500ng/mL	1ng/mL	-	10 ng/mL	108.3	9.9
						200 ng/mL	97.0	5.6
	Klonazepam	-	-	20 ng/mL	-	10 ng/mL	104.6	28.8
						200 ng/mL	118.5	7.0
Nakamura ve ark., 2009								
SPE, LC-MS/MS serum	Diazepam	0.999	10-500ng/mL	2.0ng/mL	6.8ng/mL	LOQ	98.9	11.4
						100ng	62.4	5.3
	Alprazolam	0.998	5-500ng/mL	0.6ng/mL	2.1ng/mL	LOQ	112.8	17.5
						100ng	94.5	5.4
	Klonazepam	1.000	10-500ng/mL	2.3ng/mL	7.5ng/mL	LOQ	101.8	11.8
						100ng	93.9	4.0
Borrey ve ark., 2001								
SPE, GC-MS idrar	Alprazolam	0.9996	50-1000 ng/mL	16 ng/mL	-	5 ng/mL	92.67	-
						100 ng/mL	99.27	-
						1000 ng/mL	94.8	-

Tablo XIII.'ün devamı

Saito ve ark., 2014	SPDE, LC-TOF/MS serum, idrar	Serum							
		Diazepam	>0.998	500-2000 ng/mL	1-10 ng/mL	5-50 ng/mL	50 ng/mL	93.7	3.0
							500 ng/mL	98.7	4.2
		Alprazolam	>0.998	500-2000 ng/mL	1-10 ng/mL	5-50 ng/mL	50 ng/mL	104.8	3.6
						500 ng/mL	104.7	3.1	
	İdrar								
	Diazepam	>0.998	500-2000 ng/mL	1-10 ng/mL	5-50 ng/mL	50 ng/mL	99.4	3.4	
						500 ng/mL	91.5	4.1	
					50 ng/mL	99.1	3.5		
					500 ng/mL	100.1	4.2		
Mazhar ve Binder, 1989	SPE, HPLC serum	Diazepam	>0.999	50-2000 ng/mL	-	-	50 ng/mL	100	-
							500 ng/mL	103	-
		Alprazolam	>0.999	10-200 ng/mL	-	-	10 ng/mL	100	-
							50 ng/mL	98	-
Bu çalışma	SPE, GC-MS serum	Diazepam	0.9997	1.25-30 µg/mL	0.396 µg/mL	1.201 µg/mL	7.5 µg/mL	76.67	8.17
							20 µg/mL	73.3	7.85
		Alprazolam	0.9990	5-120 µg/mL	0.887 µg/mL	2.688 µg/mL	30 µg/mL	74.54	8.27
							80 µg/mL	74.08	9.52
		Klonazepam	0.9987	10-60 µg/mL	3.472 µg/mL	10.521 µg/mL	15 µg/mL	74.6	9.38
					40 µg/mL	70.23	10.23		
		Klonazepam-TMS	0.9970	10-60 µg/mL	4.885 µg/mL	14.882 µg/mL	-	-	-

Bu çalışmada biyolojik örnekten diazepam, alprazolam ve klonazepam analizi için Adamowicz&Kala'in yönteminden yola çıkılarak, Saito ve ark. ve Mazhar ve Binder'in yöntemlerinden yararlanılarak bir analiz yöntemi geliştirildi (58, 62, 63). Örnek hazırlamada SPE yöntemi öncesinde protein çöktürme işlemi gerçekleştirildi ve bu şekilde SPE yöntemi daha kolay uygulanabilir hale geldi. Ayrıca SPE aşamasında matriks etkisini azaltmak için çeşitli çalışmalar yapıldı. Bunun için Adamowicz&Kala'nın yönteminde belirtilen yalnız ultra saf su ve Oasis HLB SPE kartuşunun üretici firmasının prosedüründe bulunan %5 MeOH ve ultra saf su ile yıkama basamağı ayrı ayrı gerçekleştirilerek karşılaştırıldı. Ancak literatürden de (60, 63) yararlanılarak yapılan denemelerle benzodiazepin analizleri için MeOH yerine asetonitrilin ultra saf su ile beraber kullanılmasının matriks etkisini azaltmak için en iyi sonucu verdiği görüldü.

Yapılan çalışmadan elde edilen doğrusallık sonuçlarına göre; diazepam için doğrusal aralık 1.25-30 µg/mL olarak belirlendi. Bu aralıkta korelasyon katsayısı $R^2= 0.9997$ ve doğru denklemi de $y=0,3949x-0,0178$ olarak bulundu. Diazepam için serumda geri kazanım oranı ve RSD değerleri 7.5 µg/mL konsantrasyonunda %76.67 ve %8.17, 20 µg/mL konsantrasyonunda %73.30 ve %7.85 bulundu. Alprazolam için doğrusal aralık 5-120 µg/mL olarak belirlendi. Bu aralıkta korelasyon katsayısı $R^2= 0.9990$ ve doğru denklemi de $y=0,2121x-0,1654$ olarak hesaplandı. Alprazolamın serumda geri kazanım oranı ve RSD değerleri 30 µg/mL konsantrasyonunda %74.53 ve %8.27, 80 µg/mL konsantrasyonunda %74.08 ve %9.52 bulundu. Klonazepam için doğrusal aralık 10-60 µg/mL olarak belirlendi. Bu aralıkta korelasyon katsayısı $R^2= 0.9987$ ve doğru denklemi $y=0,02392x-0,03803$ olarak hesaplandı. Klonazepam için serumda geri kazanım oranı ve RSD değerleri 15 µg/mL konsantrasyonunda %74.60 ve %9.38, 40 µg/mL konsantrasyonunda %70.23 ve %10.23 bulundu. Klonazepam-tms için doğrusal aralık 10-60 µg/mL olarak belirlendi. Bu aralıkta

korelasyon katsayısı $R^2 = 0.9970$ ve kalibrasyon eğrisinin denklemi de $y = 0,1159x - 0,2259$ olarak hesaplandı. Tablo 5.1.'de görülen benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında, bu çalışmanın doğrusallık çalışmalarında özellikle Diazepam ve Alprazolam için daha yüksek korelasyon katsayısına sahip olduğu, klonazepam ve klonazepam-TMS için ise benzer sonuçlar içerdiği belirlendi. Doğrusal aralık için bakıldığında ise, farklı kromatografik teknikler ve dedektörler kullanıldığından, değişken aralıklar olduğu görüldü.

Çalışmamızda geri kazanım yüzdeleri %70.23-%76.67 arasında, %RSD değerleri ise tüm maddeler için < 15 bulundu. Tablo 5.1.'e bakıldığında diazepam, alprazolam ve klonazepam için bazı çalışmalarla benzer geri kazanım sonuçlarının da olduğu görüldü (58, 59, 61). Yöntemimizin geri kazanım yüzdeleri genel olarak < 80 olmakla birlikte, düşük %RSD'ye sahip olduğundan kabul edilebilir sınırlar içerisinde (67).

LOD ve LOQ değerleri diazepam için $0.396 \mu\text{g/mL}$ ve $1.201 \mu\text{g/mL}$, alprazolam için $0.887 \mu\text{g/mL}$ ve $2.688 \mu\text{g/mL}$, klonazepam için $3.472 \mu\text{g/mL}$ ve $10.521 \mu\text{g/mL}$, klonazepam-TMS için $4.885 \mu\text{g/mL}$ ve $14.802 \mu\text{g/mL}$ 'dir. Tablo 5.1.'deki çalışmalarda LOD, LOQ değerleri ve doğrusal kalibrasyon aralığı için ng/mL ve $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında geniş bir aralıkta sonuçlar bulundu. Özellikle sıvı kromatografisi ve ardışık kütle spektrometresi kullanılan yöntemlerde daha düşük LOD, LOQ konsantrasyonlarına rastlanmaktadır (61, 62). GC-MS ile Inoue ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise GC-MS parametrelerinde farklılıklar olması (yüksek sıcaklık ve enjeksiyon hacminin fazla olması) ve cihaza verilen elüatın daha derişik hazırlanması gibi örnek hazırlama ve analiz koşullarının farklılığından dolayı daha düşük LOD konsantrasyonuna ulaşıldığı düşünülmektedir (59). Bizim çalışmamızda da sonuçlar Adamowicz ve Kala'nın çalışmasına benzer sonuç vermiştir (58).

GC-MS ile çalışırken daha polar bileşiklerin termal dayanıklılığını arttırmak, analiz sırasında bozunma olmasını önlemek için türevlendirilmesi tavsiye edilmektedir (68). Çünkü klonazepam gibi aromatik 7-nitro bileşikler kısmen bozunarak aminli bileşiklerine dönüşebilirler. Özellikle yüksek sıcaklıklarda ve analitin kolonda kalma süresine bağlı olarak bozunan ürün miktarı artabilir (69). Klonazepamın türevlendirilmesi ile LOD ve LOQ değerlerinde bir iyileşme olmadığı, türevlendirilmeden analiz edilen klonazepam çalışmasında LOD ve LOQ değerlerinin daha düşük olduğu görüldüğünden türevlendirilmeden yapılan çalışmalar hem zaman hem de tüketilen malzeme açısından daha etkin bulundu. Çalışmada klonazepam standart çözeltilerinde beklenen sonuçların alınamamasının nedeninin de maddenin termal olarak dayanıksız olması gibi özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca farklı parametreler ile denenmesine rağmen çalışma boyunca türevlendirme basamağının kromatogramlarının özellikle katım yapılmış serum örneklerinde istenen sonuçları vermemesi türevlendirme basamağının çıkarılmasına sebep oldu.

Benzodiazepinlerin sedasyon ve bilişsel performansın bozulması gibi yan etkileri nedeniyle sürücülerin direksiyon hakimiyeti, yol takibi ve acil durumlarda karar verme becerisi gibi davranışları etkilenebilir (7, 19). Özellikle yüksek dozda kullanıldıklarında ve kullanılmaya başlanmasının ilk haftalarında risk daha fazladır. Ayrıca yarılanma ömrü uzun olan benzodiazepinlerin de sürüş performansındaki olumsuz etkileri daha fazladır (7, 10). Bu nedenle benzodiazepinlerin sürüş güvenliğine etkileri üzerine çalışmalar önem kazanmaktadır.

Yol kenarı testlerinde alkol için pozitif sonuç veren 275 Koreli sürücünün kan örnekleriyle yapılan analizlerde immunoassay ile birlikte SPE ve GC-MS'den yararlanılarak madde

kullanım oranlarına bakılmıştır. Toplamda 14 pozitif sonucun 4 tanesinde benzodiazepine (diazepam ve metabolitleri) rastlanmış ve miktar tayini yapıldığında kalibrasyon eğrisinin üst noktası olan 219 ng/mL'den daha yüksek miktarda bulunmuştur (42).

Ülkemizde 2010-2011 yılları arasında adli makamlar tarafından alkol analizi talep edilen 4274 ve alkol ve madde/ilâç analizi talep edilen 91 kan numunesi Adli Tıp Kurumu'nda çalışılmıştır. Alkol için HS-GC, ilâç/madde kullanımı için de immunoassay (CEDIA) ve ardından SPE ile LC-MS/MS yönteminden yararlanılmıştır. 91 numunenin 40 tanesinde alkol, 4 tanesinde de benzodiazepine rastlanmıştır (23).

Jones ve Holmgren tarafından İsveç'te yapılan bir çalışmada bozulmuş sürüş sebebiyle yakalanan sürücülerden seçilen kan örneklerinde diazepam ve nordiazepam miktarlarına bakılmıştır. Analizler için LLE ile GC-NPD yöntemlerinden yararlanılmıştır. Analitik metodun LOQ konsantrasyonu 0.05mg/L iken sürücülerin kan örneklerindeki benzodiazepin konsantrasyonu 0.05mg/L-6.1mg/L arasında değişmektedir (43).

2012-2015 yılları İskoçya'da ölümlü trafik kazalarında 146 araç ve motorsiklet sürücüsünden alınan kan örnekleriyle yapılan toksikolojik analizlerde alkol için GC-FID ilâç/ madde için de ELISA ve GC-MS veya LC-MS'den yararlanılmıştır. 146 vakanın 118'ine tam toksikolojik analiz yapılmış ve 24ünde alkol ve 13ünde diazepam tespit edilmiştir (40).

Mura ve ark. çalışmasında ise 6 farklı hastanenin acil bölümüne gelen 900 yaralamalı trafik kazası ve kontrol grubu olarak aynı acil bölümüne travmatik olmayan sebeplerle gelen ehliyeti olan 900 hastanın kan örnekleriyle çalışılmıştır. Çalışmada alkolün yanı sıra yasal ve yasadışı ilâç ve maddelerin analizleri de yapılmıştır. Alkol için GC-FID, medikal ilâçlar ise HPLC-DAD kullanılmıştır. Yaralamalı trafik kazası sonucu kan örneği alınan 900 sürücüde

alkol seviyesi yasal sınırın üzerinde %26 sürücü bulunmuştur. Diazepam oranı %1.1 iken alprazolam oranı ise %0.2'dir (41).

Avrupa Birliği tarafından 2006 - 2011 yılları arasında gerçekleştirilen Avrupa'da Uyuşturucu Madde, Alkol ve İlaç Etkisi Altında Araç Kullanımı – Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines in Europe (DRUID Project) projesinde 13 ülkede trafikte seyir halinde bulunan yaklaşık 50.000 sürücünün kan ve ağız içi sıvılarıyla analizler yapılmıştır. Proje sonucunda alkol oranı % 3.48, yasa dışı madde % 1.9 bulunmuş, medikal ilaçlara da % 1.36 oranında rastlanmıştır. Benzodiazepinler ise %0.9 ile en sık rastlanan medikal ilaçlar olmuştur (8).

Türkiye'de 2012 yılında gerçekleştirilen Trafikte Alkol ve Uyuşturucu ile Etkin Mücadele Sempozyumu sonuç bildirisine göre, sürücüler arasında alkol tespit edilme oranının %15.4-35.2 arasında değiştiği belirtilmiştir (15).

Bu çalışmada Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Acil Tıp Polikliniği'ne yaralamalı trafik kazaları sonucu başvuran sürücülerden serum ve tam kan numuneleri alındı ve geliştirilen yöntem ile analiz edildi. Kanda alkol analizleri için ise İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Adli Tıp Enstitüsü Toksikoloji Laboratuvarı'nın rutin kanda alkol analiz yönteminden yararlanıldı.

Sürücülerden alınan 40 serum numunesinin hiçbirinde diazepam, alprazolam veya klonazepam etken maddelerine rastlanmadı. Alkol analizi için toplanan 37 tam kan numunesinin 6'sında (%16.22) etil alkole rastlandı. Ancak özel araç sürücülerine uygulanan yasal limit olan 50 mg/dL sınır olarak kabul edildiğinde, 4 sürücü (%10.81) için yasal açıdan pozitif sonuç bulundu.

Madde, ilaç ve alkol etkisi altında araç kullanımı konusunda yapılan araştırmalarla karşılaştırıldığında, çalışmaların yapıldığı yer, zaman ve amaca göre benzodiazepinler ve alkol için farklı oranlarda sonuçların çıktığı görülmüştür. Örneğin Acar ve ark.'nın çalışmasında toplam 4274 olgunun 91'inde madde ve alkol şüphesi görülmüştür. Bu şüphe edilenler arasında ise sadece 4 kişinin kanında benzodiazepin türevi madde tespit edilmiştir (23). Bu çalışmada ise hastanenin acil servisine gelen tüm yaralamalı trafik kazalarının tek bir merkezden toplanan örnekleri arasında genel bir değerlendirme yapılmaya çalışılmıştır. Ancak çalışmamızın sonucunu değerlendirirken ülkemizdeki hastanelerin acil servislerinin çalışma şartları, yoğunluğu ve hastanın sağlığının, örnek toplanmasından daha öncelikli oluşu gibi sebeplerden dolayı toplanan numune sayılarının beklenenden çok düşük olması ve şüpheli, ağır yaralamalı trafik kazalarından gelebilecek numunelerin toplanamamış olması ihtimali de göz önüne alınmalıdır. Yine Avrupa Birliği'nin çalışması olan DRUID projesinde trafikte seyir halinde olan sürücülerle genel bir değerlendirme yapılmış olup, 50.000 sürücüde benzodiazepinlere rastlanma oranının %0.9 olduğu dikkate alındığında, pozitif sonuç elde edilebilmesi için daha fazla sayıda örnek ile çalışılması gerektiği düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada yaralamalı trafik kazalarında alkolün ve benzodiazepinlerin sürüş güvenliğine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla serum örneklerinde benzodiazepinlerin yan yana tayini için seçici ve güvenilir bir yöntem geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalar ışığında, türevlendirme basamağına ihtiyaç duyulmadan diazepam, alprazolam ve klonazepam gibi ülkemizde en sık reçete edilen benzodiazepin türevlerinin biyolojik örnekte yan yana tayini için kabul edilebilir etkinlikte hızlı ve tekrar edilebilirliği yüksek bir yöntem geliştirilmiştir. Yaralamalı trafik kazalarında sürücü olan bireylerin kanında alkolün yanı sıra bu etken maddeler de aranmış ve sürücülerin hiçbirinde benzodiazepin türevi maddeye rastlanmazken, sadece 4'ünde yasal sınırın üzerinde alkol olduğu tespit edilmiştir.

Özellikle medikal kullanımıyla beraber suiistimalinin de yüksek olduğu bu ilaç grubunun trafikteki etkileri ve yaygınlığı hakkında ülkemizde yeterli çalışmanın bulunmaması bunun gibi çalışmaları önemli hale getirmektedir. Trafik kazalarının da sebep olduğu ölüm ve yaralanma oranları dikkate alındığında, benzodiazepinlerin sürücüler üzerindeki etkileri, alkol ile birlikte kullanımları ve trafikteki tespiti hakkında daha çok çalışma yapılması önerilmektedir.

Bu sebeple geliştirilen bu yöntemin uzun vadede farklı bölge hastanelerinden alınacak farklı biyolojik örneklerle ve farklı analiz şartlarıyla yapılacak benzodiazepin ve sürüş güvenliğinde madde etkisi çalışmalarına temel oluşturacağı ve katkı sağlayacağı beklenmektedir. Çalışmamızın ilerleyen zamanlarda daha fazla merkezle işbirliği yapılarak sürdürülmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Boles SM, Miotto K. Substance abuse and violence: A review of the literature. *Agression and Violent Behavior* 2003;8(2):155-174.
2. Mercan S, Açikkol M. Madde kullanımının kolaylaştırdığı suçlar: maddeler ve etkileri; deliller ve analizleri. *Türkiye Klinikleri J Foren Med* 2014;11(2):78-96.
3. Shbair MKS, Eljabour S, Bassyoni I, Lhermitte M. Durgs involved in drug facilitated crimes- part II: Durgs of abuse, prescription and over-the-counter medications. A review. *Ann Pharm Fr* 2010; 68(6): 319-331.
4. Acikkol M, Mercan S, Karadayı S. Simultaneous determination of benzodiazepines and ketamine from alcoholic and nonalcoholic beverages by GC-MS in drug facilitated crimes, *Chromatographia* 2009; 70:1295-1298.
5. Persona K, Madej K, Knihnicki P, Pieskoszewski W. Analytical methodologies for the determination of benzodiazepines in biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2015; 113:239-264.
6. Brown T, Milavetz G, Murry DJ. Alcohol, drugs and driving implications for evaluating driver impairment. *Annals of Advances in Automotive Medicine* 2013; 57: 23-32.
7. Mercan S, Türkmen Z, Açikkol M. Sürüş güvenliğini olumsuz etkileyen reçeteli ve reçetesiz ilaçlar: etkileri ve güvenlik tedbirleri. *Türkiye Klinikleri J Foren Med Adli Toksikoloji Özel Sayısı* 2015; 1(3): 21-28.
8. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Driving under the influence of drugs, alcohol and medicines in Europe - findings from the DRUID Project. Publications Office of the European Union 2012.
9. Aşirdizer M, Hekimoğlu Y. Trafikte yol kenarı alkol, uyuşturucu ve uyarıcı tarama testleri: tarihçesi ve günümüzde kullanımı. *Adli Tıp Bülteni* 2015; 20(3): 181-187.
10. Smink BE, Egberts ACG, Lusthof KJ, Uges DRA, de Gier JJ. The relationship between benzodiazepine use and traffic accidents: a systematic literature review. *CNS Drugs* 2010; 24(8):639-653.
11. Galarneau DW, Conrad EJ. Benzodiazepine intoxication and withdrawal: assessment and management. *Hospital Medicine Clinics* 2015; 4(4):513-525.
12. Leung SY. Benzodiazepines, opioids and driving: an overview of the experimental research. *Drug and Alcohol Review* 2011; 30:281-286.
13. Gök Ş. Benzodiazepinler. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2006; 2(1): 1-10.
14. Dökmeci İ, Dökmeci AH. Toksikoloji zehirlenmelerde tanı ve tedavi. (2005) 4.baskı. Nobel Tıp Kitabevi.
15. Akgür SA, Coşkunol H, (ed.). Bağımlılık yapan maddeler ve toksikolojisi. (2014) Ege Üniversitesi Yayınları Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü No: 3, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
16. Howard P, Twycross R, Shuster J, Mihalyo M Wilcock A. Benzodiazepines. *Journal of Pain and Symptom Management* 2014; 47(5): 955-964.

17. Valentine JL, Middleton R, Sparks C. Identification of urinary benzodiazepines and their metabolites: comparison of automated HPLC and GC-MS after immunoassay screening of clinical specimens. *Journal of Analytical Toxicology* 1996; 20: 416-424.
18. Hata T, Kanazawa T, Hamada T, Nishihara M, Bush AI, Yoneda H ve ark. What can predict and prevent the long-term use of benzodiazepines? *Journal of Psychiatric Research* 2018; 97: 94-100.
19. Motak L, Bayssac L, Taillard J, Sagaspe P, Huet N, Terrier P ve ark. Naturalistic conversation improves daytime motorway driving performance under a benzodiazepine: a randomised, crossover, double-blind, placebo-controlled study. *Accident Analysis and Prevention* 2014; 67: 61-66.
20. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B (ed.). *Clarke's analysis of drugs and poisons*. 4.baskı London: Pharmaceutical Press, 2011.
21. Aşıcıoğlu F. Trafikte güvenli sürüş açısından alkol, alkolün adli tıbbi değerlendirilmesi. (2009) 1.baskı, s.1-40, Beta Yayıncılık, İstanbul.
22. Wilhelmi BG, Cohen SP. A framework for "driving under the influence of drugs" policy for the opioid using driver. *Pain Physician* 2012; 15(3): 2015-230.
23. Acar F, Aker RG, Kucukbrahimoglu EE, Ates I, Erol Y, Sahin A. A review of suspected cases of driving under the influence of drugs (DUID) involved in traffic accidents in Istanbul (Turkey). *Journal of Forensic and Legal Medicine* 2013; 20: 626-631.
24. Barbone F, McMahon AD, Davey PG, Morris AD, Reid IC, McDevitt DG ve ark. Association of road-traffic accidents with benzodiazepine use. *The Lancet* 1998; 352:1331-1336.
25. DRUID (Driving Under The Influence of Drugs, Alcohol and Medicines) 6th Framework Programme. Effects of medicinal drugs on actual and simulated driving, Final Report 2011.
26. Yaşar ZF, Büken E. Başkent Üniversitesine trafik kazası nedeniyle başvuran adli olguların incelenmesi. *Adli Tıp Bülteni* 2015; 20(3): 132-137.
27. Önok RM. Trafik güvenliğini tehlikeye sokma suçu (TCK m.179). *TBB Dergisi* 2015; 121; 157-202.
28. 2918 sayılı karayolları Trafik Kanunu. Yayın tarihi ve sayısı:18.10.1983-18195, Kabul Tarihi:13.10.1983, Kanun No: 2918. http://mevzuat.meb.gov.tr/html/18195_2918.html (Son Erişim Tarihi: 10.07.2018)
29. World Health Organization. Global status report on road safety 2015. WHO Press 2015. http://www.who.int/violence_injury_prevention/road_safety_status/2015/en/ (Son Erişim Tarihi: 11.07.2018)
30. Türkiye İstatistik Kurumu & Emniyet Genel Müdürlüğü. Karayolu Trafik Kazası İstatistikleri, 2013 Haber Bülteni. Temmuz 2014.
31. Karayolları Genel Müdürlüğü & T.C. Ulaştırma Denizcilik ve Haberleşme Müdürlüğü. Trafik Kazaları Özeti 2014. Trafik Güvenliği Dairesi Başkanlığı Mayıs 2015.


32. Türkiye İstatistik Kurumu & Emniyet Genel Müdürlüğü. Karayolu Trafik Kazaları İstatistikleri, 2016 Haber Bülteni. Haziran 2017.
33. Türk Ceza Kanunu 2004. T.C. Resmi Gazete 25611,12.10.2004. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2004/10/20041012.htm> (Son Erişim Tarihi: 10.07.2018)
34. Karayolları Trafik Yönetmeliği. T.C. Resmi Gazete 23053, 18.07.1997. <http://www.mevzuat.gov.tr/Metin.Aspix?MevzuatKod=7.5.8182&MevzuatIliski=0&sourceXmlSearch=karayollar%C4%B1%20trafik%20y%C3%B6netmeli%C4%> (Son Erişim Tarihi: 10.07.2018)
35. Bachhuber MA, Maughan MC, Mitra N, Feingold J, Starrels JL. Prescription monitoring programs and emergency department visits involving benzodiazepine misuse: Early evidence from 11 United States metropolitan areas. *International Journal of Drug Policy* 2016; 28:120-123.
36. Aşıcıoğlu F, Kucukibrahimoğlu EE, İlingi U. Psychotropic drugs evaluated in the context of narcotic drugs according to the new Turkish criminal law. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 2010; 20(4):314-320.
37. Evren C, Ogel K, Çiftçi Demirci A, Evren B, Goksan Yavuz B, Bozkurt M. Prevalence of lifetime tobacco, alcohol and drug use among 10th grade students in Istanbul. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 2014; 24(3):201-210.
38. International Council on Alcohol, Drugs and Traffic Safety (ICADTS). Categorization System For Medicinal Drugs Affecting Driving Performance 2007. <http://www.icadts.nl/reports/medicinaldrugs1.pdf> <http://www.icadts.nl/reports/medicinaldrugs2.pdf> (Son Erişim Tarihi: 10.07.2018)
39. Brady JE, Li G. Prevalence of alcohol and other drugs in fatally injured drivers. *Addiction* 2013; 108(1): 104-114.
40. Hamnett HJ, Ilett M, Izzati F, Smith SS, Watson KH. Toxicological findings in driver and motorcyclist fatalities in Scotland 2012-2015. *Forensic Science International* 2017; 274:22-26.
41. Mura P, Kintz P, Ludes B, Gaulier JM, Marquet P, Martin-Dupont S ve ark. Comparison of the prevalence of alcohol, cannabis and other drugs between 900 injured drivers and 900 control subjects: results of a French collaborative study. *Forensic Science International* 2003; 133: 79-85.
42. Kim E, Choe S, Lee J, Jang M, Choi H, Chung H. Detection of drugs in 275 alcohol-positive samples of Korean drivers. *Forensic Science International* 2016; 265: 186-192.
43. Jones AW, Holmgren A. Concentration of diazepam and nordiazepam in 1000 blood samples from apprehended drivers – therapeutic use or abuse of anxiolytics? 2012; 26(3): 198-203.
44. Starkey NJ, Charlton SG, Malthotra N, Ameratunga S. Prevalence of psychotropic drug use prior to driving. *Journal of Transport & Health* 2017; 4:108-117.
45. Skoog DA, Holler JF, Crouch SR. Enstrümental Analiz İlkeleri. (2013) 6.baskı (Kılıç E, Yılmaz H, Çev.), Bilim Yayınları, Ankara.

46. Gündüz T. Kromatografi ve Elektroforez. (2015), s.1-111, Gazi Kitabevi, Ankara.
47. International Union of Pure and Applied Chemistry-Commission on Analytical Nomenclature. Nomenclature for Chromatography-IUPAC Recommendations 1993. Pure & Appl. Chem. 1993; 65(4): 819-872.
48. Özcimder M, Demirci A. Gaz ve Sıvı Kromatografileri Kromatografi Serisi 1. (2004), s.11-26, Bilim Yayıncılık, Kırıkkale.
49. Gündüz T. İnrümentel Analiz. (1988), s.519-583, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, Ankara.
50. Mcnair HM, Miller JM. Basic Gas Chromatography. New York: Wiley, 1998; 153-173.
51. Genç L (Ed.). Kromatografik sistemler. (2011), s.157-169, Bibam Yayınları 1, Eskişehir.
52. Grob RL, Barry EF. Modern Practice of Gas Chromatography. 4.baskı New Jersey, 2004.
53. Drummer O.H. Chromatographic screening of systematic toxicological analysis. Journal of Chromatography 1999;733;27-45.
54. United Nations Office on Drug and Crime. Guidelines for the forensic analysis of drugs facilitating sexual assault and other criminal acts. New York, 2011.
55. Roskar R, Lucin Trdan T. Analytical methods for quantification of drug metabolites in biological samples. Robert Roškar and Tina Trdan Lušin. Analytical Methods for Quantification of Drug Metabolites in Biological Samples, Calderon L, editor. Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis. InTech, 2012; 79-126.
56. Söylemezoğlu T, Çeçen T. Katı faz ekstraksiyon yöntemi: analitik toksikolojide uygulanması. (2003), s.5-24, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
57. Tebbett I (Ed.). Gas chromatography in forensic science. İngiltere: Ellis Horwood Limited, 1992; 55-82.
58. Adamowicz P, Kala M. Simultaneous screening for and determination of 128 date-rape drugs in urine by gas chromatography-electron ionization-mass spectrometry. Forensic Science International 2010; 198: 39-45.
59. Inoue H, Maeno Y, Iwasa M, Matoba R, Nagao M. Screening and determination of benzodiazepines in whole blood using solid-phase extraction and gas chromatography/ mass spectrometry. Forensic Science International 2000; 113: 367-373.
60. Borrey D, Meyer E, Lambert W, Van Peteghem C, De Leenheer AP. Simultaneous determination of fifteen low-dosed benzodiazepines in human urine by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography B 2001; 765: 187-197.
61. Nakamura M, Ohmori T, Itoh Y, Terashita M, Hirano K. Simultaneous determination of benzodiazepines and their metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a high resolution octadecyl silica column compatible with aqueous compounds. Biomed Chromatogr 2009; 23: 357-364.

62. Saito K, Kikuchi Y, Saito R. Solid-phase dispersive extraction method for analysis of benzodiazepine drugs in serum and urine samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2014; 100: 28-32.
63. Mazhar M, Binder SR. Analysis of benzodiazepines and tricyclic antidepressants in serum using a common solid-phase clean up and a common mobile phase. *Journal of chromatography* 1989; 497: 201-212.
64. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for industry validation of analytical procedures for type c medicated feeds # 135. 2005. <https://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM052530.pdf> (Son Erişim Tarihi: 09.07.2018)
65. Valenstein M, Taylor KK. Benzodiazepine use among depressed patients treated in mental health settings. *Am J Psychiatry* 2004; 161:654-661.
66. Akpınar A, Yaman AR, Karakus K, Atay İM, Demirci K. The frequency of benzodiazepine use in the Isparta. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 2016; 26(2):169-174.
67. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Science International* 2007; 165: 216-224.
68. Borrey D, Meyer E, Lambert W, Van Calenberg S, Van Peteghem C, De Leenheer AP. Sensitive gas chromatographic-mass spectrometric screening of acetylated benzodiazepines. *Journal of Chromatography A* 2001; 910: 105-118.
69. Blachut D, Bykas-Strekowska M, Taracha E, Szukalski B. Application of gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) to the analysis of benzodiazepines. *Problems of Forensic Sciences* 2004; 59: 5-37.

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onay Yazısı


S.B. HASEKİ EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ
İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Potansiyel Bağımlılık Maddelerinin Ve Alkolün Yaralamalı Trafik Kazalarına Etkisi			
	VARSA ARAŞTIRMA PROTOKOL/PLAN KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Münevver Açikkol			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Klinik			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Epidemiyolojik			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	COK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

Aslı Etkin
 Dr. FUM SAR
 İ.Ü. ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ
 ETİK KURULU BAŞKANI

Sayfa 1



S.B. HASEKİ EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ
İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dil
	ARAŞTIRMA PROTOKOL/PLANI			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BELGELENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>		
	SKORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	HASTA KARTSÖZLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>		
	ELAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:242	Tarih: 22.07.2015		
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gereke, amac, yaklaşımları ve yöntemleri dikkate alınarak incelenenay çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen koşullarda gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıda katılan Etik Kurul üyeleri tarafından salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

S.B. HASEKİ EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

CALISMA ENASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Uzm. Dr. Fuat Şar

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Çinstiyet	Araştırma ile İlgili	Katılım *	İmza
Uz. Dr. Fuat ŞAR	Dahiliye	Sağlık Bakanlığı	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Şehin DURSUN	Biyoetik	İstanbul Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Murat ELEYLİ	Çocuk Hastalıkları	Sağlık Bakanlığı	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Ahmet DİRİCAN	Biyoistatistik ve Tıp Bilimleri	İstanbul Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Zehra Yazıcı	Farmakoloji	İstanbul Üniversitesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. A. Özlem Çeliker	Nöroloji	Sağlık Bakanlığı	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Mustafa KOLDAŞ	Biyoetik	Sağlık Bakanlığı	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Özcan ŞENÖZ	Kl. Mikrobiyoloji	Sağlık Bakanlığı	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>

Aşk pibi diler **Dr. Fuat ŞAR**
Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu



S.B. HASEKİ EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ
İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

Doç.Dr. Murat HANCI ÖZKUL	Evlük Durum Değişikliği Hastalıkları	Sağlık Bakanlığı	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	H. Hançiroğlu M. Hançiroğlu
Op.Dr. Genco ÇELİK	Genel Cerrahi	Sağlık Bakanlığı	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Engin ERİN	Avukat	Serbest	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Mehmet ÇOKLUK	Mal. Y. Mühendisi	Serbest Gözlemci	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

* Toplamda Bulunma

Askipibiçini

Dr. Fikri S. ...
Başkan

Ek 2.**ASGARI BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU****Çalışmanın başlığı: BAZI BENZODİAZEPİN GRUBU İLAÇLARIN YARALAMALI TRAFİK KAZALARINDAKİ ETKİSİ**

Bu çalışma bilimsel bir araştırma olup, amacı benzodiazepin grubu ilaçların ve metabolitlerinin idrar ve kanda analiz edilmesi ve yöntem geliştirilmesidir.

Araştırma için Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi acil polikliniğine yaralamalı trafik kazası sonucu başvuran ve çalışmaya katılmayı onaylayan sürücülerden idrar ve kan örnekleri alınacaktır. Alınan idrar ve kan örnekleriyle İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü'nde gerekli analizlerin yapılarak benzodiazepin grubu reçeteli ilaçların ve metabolitlerinin miktarlarının tayin edilmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışma için gönüllü bireylerden kan ve idrar örneklerinin alınması esnasında, bireye **herhangi bir zarar vermesi ve tehlike oluşturması söz konusu değildir**. Çalışma sırasında araştırma amacıyla yapılacak analiz giderleri için gönüllü bireyin kendisinden veya bağlı olduğu sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir **ücret talep edilmeyecektir, gönüllü yazılı onay vermiş olsa da araştırmanın her hangi bir döneminde araştırmadan vazgeçmekte özgürdür**, gönüllünün **kimlik bilgileri ve tüm kayıtları saklı tutulacaktır, araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliğinin gizli kalacaktır**.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum ve söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Bazı benzodiazepin grubu ilaçların yaralamalı trafik kazalarındaki etkisi araştırması kapsamında alınan kan ve idrar örneklerimin;

- a) *Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum*
- b) *İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum*
- c) *Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum*

Gönüllünün;

Adı: _____ Soyadı: _____ İmzası: _____ Tarih: _____
Telefon no: _____ Adres: _____

Gerekliyse Yasal Temsilcisinin

Adı: _____ Soyadı: _____ İmzası: _____ Tarih: _____

Projede Araştırmacı

Adı, Soyadı: Nihan Doğusan Gökçe **İmzası:** _____ **Tarih:** _____

Tel: 0533 7334706

e-posta: nihandogusan@gmail.com

Ek 3. Katılımcı Bilgi Formu

<input type="checkbox"/> Acil	Tarih:		Kaza tarihi:		Kaza saati:	
	Hastane adı:		Şiddeti:		Yaralamalı	
	Doktor adı:		Ölümlü			
Hasta Adı:	Yaşı:	Kilosu:	Doğum Yeri:			
			Hasta Tel No:			
Eğitim:	Yok	İlkokul	Ortaoku I	Lise	Üniversite	Lisansüstü
Mesleği				Medeni hali		
Kullandığı ilaçlar	<i>Kronik ya da akut kullandığı ilaçlar nelerdir?</i>					Yok <input type="checkbox"/>
Son ilaç kullanım saati:	<i>Hangi ilacı saat kaçta içmiş?</i>					
Bilinen rahatsızlıkları	Depresyon Diyabet KOAHA Diğer:..... Hiçbir hastalığı yok <input type="checkbox"/>	Kalp-Damar Hast. Hipertansiyon Epilepsi	Urtiker Alerji Uyku Apnesi			
Yakın zamanda geçirdiği hastalık var mı?	Soğuk algınlığı Enfeksiyon Vertigo	Cerrahi operasyon Diğer:..... Yok				
Kaza öncesinde ve sırasında sürücünün herhangi bir şikayeti var mıydı?	Baş dönmesi Zihin bulanıklığı Denge kaybı Hiçbir şikayeti yok <input type="checkbox"/>	Halsizlik, Mide bulantısı Dikkat eksikliği	Uyku hali Görme bozukluğu Diğer:.....			
Hastanın Bilinç durumu						
Hastanın klinik tablosu	GSK:	TA:	Nb:			
	SS:	Ateş:	SPO ₂ :			
	Diğer:					
Numune alındığı tarih ve saat:	Tarih:		Saat:			
Numune türü ve miktarı	İdrar: mL		Kan:mL			
Hastaya tedavi sırasında uygulanan ilaçlar						

ÖZGEÇMİŞ

Nihan DOĞUSAN GÖKÇE
25.12.1988, İstanbul
0533 733 47 06, nihandogusan@gmail.com

EĞİTİM

İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Yüksek Lisans Programı
2013- Devam Ediyor

Boğaziçi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Lisansı
2006- 2012

MESLEKİ DENEYİM ve STAJLAR

İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Toksikoloji Laboratuvarı
Kısmi Zamanlı Öğrenci, Nisan – Haziran 2017

Asitane Kültür Sanat Eğitim ve Dayanışma Derneği
Proje Koordinatörü, Eylül 2014 -Temmuz 2015

Tekstil Kimyasalları Sanayi Ticaret Ltd.
Kalite Kontrol Laboratuvarı – Staj, Ağustos 2012

Boğaziçi Üniversitesi
Polimer Kimyası Laboratuvarı – Gönüllü çalışma, Eylül – Haziran 2011

Biofarma İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.
Kalite Kontrol Laboratuvarı – Staj, Ağustos - Eylül 2010

Boğaziçi Üniversitesi
Polimer Kimyası Laboratuvarı – Staj, Temmuz - Ağustos 2008

ALINAN EĞİTİMLER ve SERTİFİKALAR

29-30 Kasım 2014 - 1. Uluslararası Adli Toksikoloji Kongresi ve Çalıştayı
Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü

19-20 Eylül 2014 – 4. Tıp Hukuku Günleri - Adli Toksikoloji Kursu
İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, Adli Tıp Uzmanları Derneği

KATKIDA BULUNULAN YAYINLAR

O. Karahan, K. Aydın, S. Edizer, N. Doğusan, D. Avcı, "Development of Reactive Methacrylates Based on Glycidyl Methacrylate", J.Polym. Sci. Part A: Polm. Chem., 48, 3787, 2010 - lisans eğitimi süresince alınan araştırma teknikleri dersinde çalışmalarına katıldığı makale

KONGRE ve SEMPOZYUM KATILIMLARI

2nd Regional Meeting of TIAFT, 30 Ekim - 2 Kasım 2016, ANTALYA
Açıkkol M., Doğusan Gökçe N., Türkmen Z., Mercan S., Poster Sunumu,
"PRESCRIPTION DRUG ABUSE AND RELATED TYPES OF CRIME"